ZELLBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR REGENERATION ISOLIERTER PROTOPLASTEN HÖHERER PFLANZEN

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

GÜNTHER HAHNE

aus Iserlohn

1985

UNIV. LIBRARY NYC

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546527_0005

ZELLBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR REGENERATION ISOLIERTER PROTOPLASTEN HÖHERER PFLANZEN

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

GÜNTHER HAHNE

aus Iserlohn

1985

Tag der mündlichen Prüfung:	25. Januar 1985
Dekan:	Prof. Dr. K.-A. Kovar
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. H. Ninnemann
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. F. Hoffmann

INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG		1
MATERIAL UND METHODEN		10
M.1.	Pflanzenmaterial	10
M.1.1.	Nicotiana spec.	10
M.1.1.1.	Anzucht im Gewächshaus	10
M.1.1.2.	Sterile Anzucht	10
M.1.1.3.	Callusinduktion	11
M.1.2.	Hibiscus rosa-sinensis L.	11
M.1.2.1.	Anzucht im Gewächshaus	11
M.1.2.2.	Callusinduktion und Calluskultur	12
M.2.	Isolierung und Kultur von Protoplasten	12
M.2.1.	Mesophyllprotoplasten	12
M.2.2.	Callusprotoplasten	13
M.3.	Regeneration von Pflanzen	14
M.3.1.	Regeneration aus Callus	14
M.3.2.	Regeneration aus isolierten Protoplasten	14
M.4.	Untersuchungen im Magnetfeld	15
M.4.1.	Apparativer Aufbau	15
M.4.2.	Versuchsdurchführung und Auswertung	15
M.5.	Calcofluor White- Färbung	16
M.5.1.	Versuchsdurchführung	16
M.5.2.	Genetische Analyse	16
M.6.	Laser Mikrochirurgie	16
M.6.1.	Apparativer Aufbau	16
M.6.2.	Kulturkammer	17
M.6.3.	Video- Cinematographie und Image- Processing	18
M.6.4.	Versuchsdurchführung und Auswertung	18
M.7.	Untersuchungen mit Hemmstoffen und Vitalfarbstoffen	19
M.7.1.	Cytochalasin B	19
M.7.2.	Colchicin	19
M.7.3.	Taxol	19
M.7.4.	Glycerin	19
M.7.5.	Deuteriumoxid	20
M.7.6.	Ionophor A23187	20
M.7.7.	Trypanblau	20
M.7.8.	Lucifergelb	20
M.8.	Elektronenmikroskopie und Seriendünnschnitte	21

M.8.1.	Fixierung von Protoplasten	21
M.8.2.	Dreidimensionale Rekonstruktion eines Protoplasten	22
M.9.	Immunfluoreszenz	23
M.9.1.	Antikörper	23
M.9.2.	Versuchsdurchführung und Auswertung	23
M.10.	Kulturmedien	26
M.10.1.	Protoplastenkultur	26
M.10.1.1.	NT- Medium	26
M.10.1.2.	Q- Medium	27
M.10.2.	Calluskultur	28
M.10.2.1.	MS-C-20- Medium	28
M.10.2.2.	MG- Medium	29
M.10.3.	Morphogenese- Induktion	29
M.10.3.1.	B_5+1.5mg/l BAP	29
M.10.3.2.	B_5- Medium	30
M.10.4.	Sproßkultur	31
M.10.4.1.	1/2 MS- Medium	31
ERGEBNISSE		32
E.1.	Untersuchungen im Magnetfeld	32
E.1.1.	Protoplasten	32
E.1.2.	Morphogenese	34
E.2.	Zellwandbildung in Protoplastenkulturen	34
E.2.1.	Calcofluor White als Vitalfarbstoff	34
E.2.2.	Difluoreszenz von Calcofluor White gefärbtem Zellwandmaterial	35
E.2.3.	Beobachtung der Zellwandbildung in ab initio gefärbten Protoplastenkulturen	36
E.2.4.	Laser Mikrochirurgie an Calcofluor White-positiven Strukturen	40
E.2.5.	Genetische Analyse von regenerierten Pflanzen aus ab initio Calcofluor White- gefärbten Protoplastenkulturen	40
E.3.	Plasmastränge, Plasmaströmung und Protoplastenform	41
E.3.1.	Entwicklung einer Kulturkammer für Laser- Mikrochirurgie	41
E.3.2.	Zeitraffer- Beobachtung an Protoplasten	42
E.3.3.	Mikrochirurgie an Plasmasträngen	43
E.3.4.	Hemmstoffbehandlung von Protoplasten	46
E.3.4.1.	Mikrotubuli- Hemmstoffe	47
E.3.4.1.1.	Colchicin	47
E.3.4.1.2.	Taxol	47

E.3.4.2.	Mikrofilament- Hemmstoffe	48
E.3.4.2.1.	Phalloidin	48
E.3.4.2.2.	Cytochalasin B	48
E.3.5.	Elektronenmikroskopische Untersuchung der Callusprotoplasten	50
E.4.	Protoplastenfusion mittels Laser	51
E.5.	Dreidimensionale Rekonstruktion eines Callus- Protoplasten	52
E.6.	Untersuchungen an sich nicht teilenden Protoplasten	54
E.6.1.	Besonderheiten der verwendeten Zellinien	54
E.6.2.	Induktion von Teilungen mittels DMSO	55
E.6.2.1.	Hibiskus- Kulturen	55
E.6.2.2.	Colchicin- inhibierte N. glutinosa Kulturen	57
E.6.3.	Andere potentielle Induktoren	58
E.6.4.	Immunfluoreszenz- Beobachtungen	59
E.6.5.	Ausdehnung der Ergebnisse auf andere Zelltypen	61
E.7.	Immunfluoreszenz- Untersuchungen an Mesophyll- Protoplasten	62
DISKUSSION		64
D.1.	Untersuchungen im Magnetfeld	64
D.2.	Zellwandbildung bei isolierten Protoplasten	66
D.3.	Plasmastränge, Plasmaströmung und Protoplastenform; Laser- Microchirurgie	69
D.4.	Dreidimensionale Rekonstruktion eines Callus- Protoplasten	74
D.5.	Teilungsinduktion in nichtteilenden Protoplasten	76
D.6.	Immunfluoreszenz von Mikrotubuli in Mesophyll- Protoplasten	80
LITERATURVERZEICHNIS		89
ZUSAMMENFASSUNG		103

EINLEITUNG

Bei ständig wachsender Erdbevölkerung werden die Anforderungen an die landwirtschaftliche Produktivität weiterhin steigen. Nach den Prognosen der Studie "Global 2000" (Kaiser, 1980) wird die Zunahme der pflanzlichen Nahrungsmittelproduktion im Weltdurchschnitt jährlich ca. 2% betragen müssen, um den kommenden Anforderungen gerecht zu werden: eine Steigerungsrate, die selbst in den letzten 20 Jahren nur selten erreicht wurde. Ein großer Teil der erhöhten Nahrungsmittelerzeugung wird auch weiterhin einem verstärkten Einsatz von Düngemitteln, Pestiziden, Herbiziden und künstlicher Bewässerung zu verdanken sein (z.B. Scowcroft und Larkin, 1982). Abgesehen von den oft negativen Auswirkungen auf die Umwelt, die diese Anbau- Techniken haben können, sind sie kostenintensiv und deswegen, zumindest in vielen Ländern der dritten Welt, nur sehr begrenzt einsetzbar. Andererseits zeigt es sich jedes Jahr von neuem, daß die Verteilung der Nahrungsmittel im Weltmaßstab sehr problematisch ist und daher große Zuwachsraten in den hochindustrialisierten Ländern nur in geringem Maße dazu beitragen können, das Ernährungsproblem in Drittweltländern langfristig zu lösen. Obwohl Zukunftsprognosen (z.B. Kaiser, 1980; Meadows et al., 1974) nur mit großer Vorsicht zu beurteilen sind, ist doch abzusehen, daß die Anforderungen an die Pflanzenzüchtung wachsen werden und die konventionellen Züchtungsmethoden durch andere, effektivere Techniken unterstützt werden müssen (Übersicht bei Melchers, 1977; Vasil et al., 1979). Dies gilt besonders für die Hochzucht der noch wenig bearbeiteten Kulturpflanzen- Arten der dritten Welt, für die Züchtung von Linien zum Anbau auf bisher wenig benutzbaren Böden in potentiellen Hungergebieten, aber auch für überproduzierende Länder, beispielsweise zur Kombination von züchterisch wichtigen Merkmalen, wie cytoplasmatische männliche Sterilität, mit praktisch wichtigen Merkmalen, wie

Krankheitsresistenz und erhöhter Streßtoleranz gegen immer unbrauchbarer werdende Böden. Große Hoffnungen setzt man z.B. in die Gewebekultur zur Produktion krankheitsfreier Pflanzen und Erhaltung wertvoller Genotypen. Die weitaus vielversprechendsten Bemühungen konzentrieren sich allerdings darauf, Einzelzellkulturen für die Lösung züchterischer Probleme einzusetzen (Melchers, 1977; Thomas et al., 1979). Als echte pflanzliche Einzelzellkulturen können bislang nur Kulturen von isolierten Protoplasten und von Mikrosporen angesprochen werden. Im Hinblick auf die praktische Pflanzenzüchtung führte besonders die Produktion haploider und homozygoter Pflanzen mittels Antheren- und Mikrosporenkultur bereits zu ersten praktischen Erfolgen (z.B. Anonymus, 1974; Mendiburu et al., 1974; Nakamura et al., 1974; Anonymus, 1976; Yin et al., 1976; Hoffmann et al., 1982).

Diese Einzelzellkultur- Techniken machen sich die potentielle Fähigkeit isolierter pflanzlicher Zellen zunutze, in Kultur zur Pflanze zu regenerieren. Als Quelle der erforderlichen totipotenten Zellen, nämlich Mikrosporen, mechanisch oder enzymatisch isolierte somatische Zellen oder isolierte Protoplasten, kommen unterschiedliche Pflanzenmaterialien in Frage (Thomas et al., 1979). Hierzu zählen neben Gewebestücken auch isolierte Organe und Embryonen sowie unterschiedliche Herkünfte aus bereits angelegten sterilen Kulturen.

Besonders isolierte Protoplasten weisen unter dem Gesichtspunkt der genetischen Manipulierbarkeit interessante Aspekte auf. Seit der ersten Regeneration von kompletten Pflanzen aus isolierten Tabak- Mesophyll- Protoplasten (Takebe et al., 1971) sind aus Protoplasten vieler Spezies Pflanzen regeneriert worden (Übersicht siehe Evans und Bravo, 1983). Isolierte Protoplasten sind als einzige echte pflanzliche Einzelzellkultur die am besten geeigneten Objekte zur genetischen Manipulation: sie können miteinander fusioniert werden (Kao und Michayluk, 1974; Wallin et al., 1974; Übersicht z.B. bei Constabel, 1984); mutagene

Behandlungen mit anschließender Selektion können analog zu mikrobiologischen Techniken durchgeführt werden (Übersicht und Diskussion z.B. bei Melchers, 1977); fremde Moleküle, z.B. DNA, können von den zellwandlosen Protoplasten aufgenommen (Übersicht z.B. bei Schell et al., 1982) oder können mikroinjiziert werden (Steinbiss und Stabel, 1983). Leider ist die Regenerierbarkeit von Protoplasten allerdings bei weitem keine voraussetzbare Eigenschaft einer Art oder eines Gewebes. Der weitaus größte Teil jener Arten, die aus isolierten Protoplasten wieder zur Pflanze regeneriert werden konnten, gehören zur Familie der Solanaceen (z.B. Evans und Bravo, 1983). Besonders schwierig dagegen verhalten sich die Monokotyledonae (z.B. King et al., 1978; Potrykus, 1979; Vasil und Vasil, 1979). Getreide und (Weide-) Gräser, als wichtigste Vertreter der Einkeimblättrigen, sind jedoch in der einen oder anderen Form Grundlage für den überwiegenden Teil der Weltnahrungsmittel und stehen deshalb besonders dringend zur Bearbeitung an. Innerhalb dieser Gruppe wurde die Regeneration von Protoplasten zu Pflanzen erst in einem Fall berichtet, nämlich bei Callusprotoplasten von Mohrenhirse (Vasil und Vasil, 1980). Von Mesophyllprotoplasten aus Getreiden, deren Regeneration besonders wünschenswert wäre, konnte noch für keine Art ein erfolgreiches Experiment berichtet werden (Vasil, 1982). Um dieses limitierende Kulturproblem zu überwinden, sind zahlreiche groß angelegte Versuche zur Optimierung des pflanzlichen Ausgangsmaterials und der Kulturbedingungen durchgeführt worden. Obwohl empirische Ansätze solcher Art zu zahlreichen kleinen Teilerfolgen führten, bleiben die grundsätzlichen Schwierigkeiten bestehen (Potrykus, 1979; neueste Übersicht bei Dale, 1983). Vor diesem Hintergrund ist es wünschenswert, möglichst viele Informationen bezüglich der Zellbiologie und Physiologie isolierter Protoplasten zu sammeln, die es dann ermöglichen, das Regenerations- Problem analytisch anzugehen.

Die besondere Eignung isolierter Protoplasten für

pflanzenphysiologische Untersuchungen wurden schon um die Jahrhundertwende erkannt und einige ihrer Charakteristika beschrieben (z.B. Hanstein, 1880; Klercker, 1892; Küster, 1935). Küster sagte bereits 1935 genetische Anwendungen für Protoplasten voraus, z.B. die Fusionierung, wenn es gelänge, genügend große Mengen dieser Einzelzellen zu isolieren. Die Massengewinnung war mit der damals verwendeten mechanischen Isolierungstechnik nicht möglich. Wirklichen Auftrieb erhielt die Protoplasten- Forschung und -Technologie dann mit der Einführung der enzymatischen (Massen-)Isolierung (Cocking, 1960; Takebe et al., 1968). Damit gewann der Protoplast als Objekt der pflanzenphysiologischen Forschung an Bedeutung, nicht nur, wie vorher, als Mittel. Seither wurden sehr viele zellphysiologische Untersuchungen an isolierten Protoplasten durchgeführt, hauptsächlich zu Zellwandregeneration und dem Schicksal der Chloroplasten. Die Literatur hierzu ist so umfangreich, daß nur eine Auswahl genannt werden kann (z.B. Gigot et al., 1972; Wallin und Eriksson, 1973; Fowke et al., 1973; Takebe et al., 1973; Hanke und Northcote, 1974; Fowke et al., 1974a; Fowke et al., 1974b; Meyer und Abel, 1975; Gigot et al., 1975; Schilde-Rentschler, 1977; Herth und Meyer, 1977; Meyer und Herth, 1978; Taylor und Hall, 1978; Taylor und Hall, 1979; für Übersichtsartikel siehe Fowke und Gamborg, 1980, und Galun, 1981).

Nach diesen Untersuchungen unterscheiden sich z.B. frisch isolierte Tabak- Mesophyllprotoplasten, abgesehen von der fehlenden Zellwand, in ihrer Ultrastruktur nicht wesentlich von einer Mesophyllzelle im Ausgangsgewebe. Ein Zustand vorübergehender geringer metabolischer Aktivität wird durch die vergleichsweise geringe Zahl von Ribosomen in der Anfangsphase der Kultur angezeigt. Bald darauf normalisiert sich jedoch die Zahl der Ribosomen (Gigot et al., 1975). Einer der ersten Regenerationsschritte ist die Rekonstruktion der Zellwand (z.B. Schilde-Rentschler, 1977). Darauf folgt die Dedifferenzierung der Zelle, ein Prozess, bei dem sich der Phänotyp des ehemaligen Protoplasten dem einer meristematischen Zelle annähert (z.B. Gigot

et al., 1975), d.h., die Zelle wird plasmareicher, die zentrale Vakuole verliert ihre dominierende Stellung, der Kern wandert in das Zentrum der Zelle und neue Cytoplasmastränge werden ausgebildet. Während dieser Vorgänge ändert sich die Zellform von der charakteristischen Kugelform des zellwandlosen isolierten Protoplasten nach oval. Gleichzeitig mit diesen Veränderungen bilden sich die Chloroplasten zu Proplastiden zurück (Thomas und Rose, 1983). Nach 1-5 Tagen, je nach Art, Herkunft und Vorgeschichte des Donormaterials, sind die ersten geteilten Zellen sichtbar.

Die weitere Entwicklung zur Pflanze kann prinzipiell auf zwei Wegen geschehen: (i) Es kann sich ein Kallus bilden, der später, auf ein Morphogenesemedium transferiert, Sprosse entwickelt (Organogenese). Dies scheint der häufigere Differenzierungsweg für die meisten zweikeimblättrigen Pflanzen zu sein (z.B. Takebe et al., 1971). (ii) Im anderen Fall entwickeln sich Protoplasten mehr oder weniger direkt über embryoide Strukturen zu normalen Embryonen mit Cotyledonen und Keimwurzeln (Embryogenese, Reinert, 1959; Übersichtsartikel z.B. bei Kohlenbach, 1978; Sharp et al., 1980 und Vasil, 1983). Da bei Gewebekulturen von Getreiden die Regeneration zur Pflanze über Embryogenese häufig leichter zu erzielen ist als über Organogenese (z.B. Vasil, 1982), ist zu vermuten, daß auch die Regeneration aus Protoplasten eher auf diesem Wege zu erreichen ist.

Bei vielen Arten beginnt das Regenerations- Problem schon bei der Auslösung der ersten Zellteilung von Protoplasten in Kultur. Um den Teilungsmechanismus zu studieren, benötigt man ein experimentelles System mit verläßlich hoher Protoplastenausbeute und gleichmäßiger Qualität. Leider gehen so viele Variablen und Unwägbarkeiten in die Protoplastenisolierung ein, daß ein solches System nur ausnahmsweise und meist nur für einen begrenzten Zeitraum erhalten werden kann. Zum Beispiel wird die experimentelle Auswertung dadurch erschwert, daß auch in relativ zuverlässigen Standardsystemen, wie z.B. Tabak, Präparationen an

manchen Tagen um ein Mehrfaches bessere Teilungsraten haben können als an anderen. Ein Maß für die Qualität einer Protoplastenpräparation ist die sogenannte "Plating Efficiency", die den Prozentsatz der sich teilenden ausplattierten Zellen angibt. Sie kann auf die Zellzahl direkt nach der Isolierung oder die Zahl der überlebenden Zellen nach unterschiedlicher Kulturdauer bezogen sein, was Vergleiche von Literaturdaten zusätzlich erschwert.

Die anfangs erwähnten zellbiologischen und physiologischen Untersuchungen fanden bisher nur wenig Anwendung auf Experimente zur Kultur und Regeneration isolierter Protoplasten. Die weitaus meisten Ergebnisse wurden empirisch durch Optimierung des Donormaterials und der Isolations- und Kulturbedingungen erzielt (z.B. Vasil, 1982). Trotz enormer Anstrengungen in dieser Richtung scheint zumindest für das Problem der Getreide ein toter Punkt erreicht zu sein (Potrykus et al., 1976; neuere Übersicht bei Vasil, 1982). Die grundsätzlichen Schwierigkeiten, die die Protoplastenregeneration beinhaltet, stellen eines der wesentlichen Hemmnisse dar, das der genetischen Manipulation vieler Arten noch im Wege steht. Die richtungsweisenden Ergebnisse, die hierzu am Modellsystem Tabak erzielt wurden (Otten et al., 1981), lassen sich nur dann ausweiten, wenn es gelingt, die Protoplastenregeneration generell zu meistern und manipulierte Zellen reproduzierbar und aberrationsfrei aufzuziehen (Vasil und Vasil, 1979; Flavell, 1982).

Die vorliegende Arbeit soll, an diese Überlegungen anknüpfend, mittels weiterer physiologischer und zellbiologischer Untersuchungen eine Brücke zwischen Zellkultur und Zellbiologie schlagen. Es wurde versucht, die zwei wichtigsten Schritte bei der Regeneration einer Zelle zur Pflanze - Induktion der Teilung und Induktion der Morphogenese - analytisch, und nicht primär empirisch, zu bearbeiten. Da der erste Schritt, die Auslösung der Teilung, weniger komplex erscheint und als erster Schritt auch logischerweise zuerst bearbeitet wird, wurde das Hauptaugenmerk

auf die frühen Entwicklungen kultivierter isolierter Protoplasten gerichtet. Im Verlauf dieser Arbeit konnte eine in vivo (vitale) Fluoreszenzfärbung für die Zellwand entwickelt und erstmals die Zellwandbildung am lebenden Protoplasten verfolgt werden. Des weiteren wurden Informationen zur Plasmaströmung, zur Organisation des Cytoplasmas und zu Interaktionen von Cytoskelett und Zellform gesammelt. Hierzu wurde erstmals bei isolierten Zellen höherer Pflanzen Laser- Mikrochirurgie eingesetzt. Schließlich gelang es, an einem Modellsystem die Teilungsunfähigkeit bestimmter isolierter Protoplasten auf molekulare Grundlagen zurückzuführen und zu beheben. Hierbei ergaben sich weitere Einblicke in Struktur und Funktion des pflanzlichen Cytoskeletts.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich hauptsächlich mit Mikrofilamenten und Mikrotubuli. Deshalb sollen diese beiden Strukturen etwas eingehender beschrieben werden. Das pflanzliche Cytoskelett besteht im wesentlichen aus ähnlichen Komponenten wie das tierische. Prominenteste Bestandteile sind Mikrotubuli, Mikrofilamente und eine Reihe anderer filamentöser Strukturen, die in tierischen Zellen als intermediäre Filamente bekannt sind (kurze Übersicht bei Birchmeier, 1984). Mikrofilamente sind kontraktile Actomyosin- Fibrillen, ähnlich den bekannten Myofibrillen (Jackson, 1982). Sowohl Actin als auch Myosin konnten in den Zellen höherer Pflanzen identifiziert werden (z.B. Jackson, 1982; Vahey et al., 1982). Die Identifizierung von Mikrofibrillen in der Zelle geschieht elektronenmikroskopisch (Kamiya, 1981), mittels Immunfluoreszenz (z.B. Weber, 1975), mittels spezifischer fluoreszenzmarkierter Hemmstoffe wie Phallacidin (Barak et al., 1980), durch Dekoration mit schwerem Meromyosin, wobei sich eine charakteristische Pfeilstruktur ergibt (Palevitz, 1980) oder durch Hemmstoffuntersuchungen mit z.B. Cytochalasin B (z.B. Bradley, 1973; Palevitz, 1980; Nothnagel et al., 1981).

Der augenfälligste Effekt von Actomyosin- Fibrillen in Pflanzenzellen ist die Plasmaströmung, die durch Mikrofilamente bewirkt wird (Übersicht bei Allen und Allen, 1978a und Kamiya,

1981). Die Anwesenheit von Mikrofilamenten in der mitotischen Spindel läßt auf eine Funktion bei der Chromosomenkontraktion und -Bewegung schließen; dies ist jedoch noch nicht abgesichert (Jackson, 1982).

Mikrotubuli sind tubuläre Strukturen von ca. 25nm Durchmesser mit einem Hohlraum von ca. 15nm Durchmesser (Hyams, 1982). Sie setzen sich aus alpha- und beta- Tubulin Monomeren zusammen. Bei der Isolierung werden meist sogenannten Mikrotubuli- assoziierte Proteine (MAP's) mitgereinigt, die relativ fest an die Mikrotubuli gebunden scheinen und möglicherweise eine physiologische Rolle spielen (Hamel et al., 1981; Gunning und Hardham, 1982). Die Identifizierung der Mikrotubuli geschieht elektronenmikroskopisch (z.B. Hyams, 1982), durch Immunfluoreszenz (Lloyd et al., 1979; van der Valk et al., 1979; Wick et al., 1981; Schmit et al., 1983) oder mittels spezifischer Hemmstoffe wie z.B. Colchicin (z.B. Hardham und Gunning, 1980).

Obwohl Mikrotubuli keine kontraktilen Strukturen sind, werden ihren Funktionen auch Bewegungen zugeordnet, z.B. Flagellenbewegung, Chromosomenbewegung und die Bewegung anderer Organelle (Übersicht z.B. bei Dustin, 1978). Zur Erklärung wird u.a. das sogenannte treadmilling herangezogen, eine Eigenart der Mikrotubuli, bei der an einem Ende depolymerisiert und am anderen Ende polymerisiert wird. Auf diese Weise kann ein fixer Marker über den gesamten Mikrotubulus transportiert werden (Hyams, 1982). Weitere Funktionen von Mikrotubuli schließen eine Beteiligung bei der Bildung der Zellplatte und bei sekretorischen Vorgängen ein, sowie Auswirkungen auf die Zellform (Dustin, 1978). Die Beeinflussung der Zellform kann direkt durch die cortikalen Mikrotubuli erfolgen oder indirekt durch die Beeinflussung der Richtung, in der Zellulose- Mikrofibrillen angelagert werden (ein Vergleich verschiedener Modelle findet sich bei Heath und Seagull, 1982).

Zellulose- Mikrofibrillen gehören nur im weiteren Sinne zum Cytoskelett. Sie bilden zusammen mit einer Reihe anderer

Komponenten eine Art Exoskelett der Pflanzenzelle. Ihre Biosynthese ist noch Gegenstand intensiver Forschung. Es ist jedoch wahrscheinlich, daß sie durch rosettenartige, membrangebundene Enzymkomplexe gebildet zu werden (eine Übersicht hierzu findet sich bei Montezinos, 1982 und bei Heath und Seagull, 1982). Die Orientierung der Mikrofibrillen zeigt in vielen, aber längst nicht allen Fällen eine überraschende Korrelation mit den unter dem Plasmalemma befindlichen cortikalen Mikrotubuli. Hieraus wurde eine leitende Funktion der Mikrotubuli für die Membrankomplexbewegung abgeleitet, eine Hypothese, die nicht unumstritten ist (Übersicht und Diskussion bei Robinson und Quader, 1982).

Die vorliegende Arbeit enthält auf den ersten Blick recht unterschiedliche experimentelle Ansätze, die sich aber alle mit einem vermuteten Zusammenhang zwischen der Regeneration isolierter Protoplasten und Komponenten des Cytoskelettes beschäftigen. Die Ergebnisse zeigen in der Tat eine wesentliche Bedeutung des Cytoskeletts für die frühe Entwicklung der Protoplasten.

Die experimentelle Arbeit erfolgte in zwei Abschnitten. Das Erlernen der Gewebekulturtechniken, die Untersuchungen zur Zellwandbildung und die Untersuchungen zur Callusmorphogenese fanden in Deutschland, am Max-Planck-Institut für Zellbiologie in Ladenburg, statt. Ein Umzug des Labors in die Vereinigten Staaten von Amerika, an die University of California Irvine, bedingte Weiterführung und Abschluß der Arbeit dort, hauptsächlich mit Experimenten zu Laser- Mikrochirurgie, zur Zellrekonstruktion und zur molekularen Analyse und Therapie sich nicht teilender Zellen.

MATERIAL UND METHODEN

M.1. Pflanzenmaterial

M.1.1. Nicotiana spec.

Es wurden Pflanzen der Arten Nicotiana glutinosa L., N. plumbaginifolia L. sowie die Varietäten "Xanthi" und "atropurpurea" von N. tabacum L. sowohl im Gewächshaus als auch unter sterilen Bedingungen als Sproßkultur angezogen. Die Anzuchtbedingungen waren für alle Arten dieselben.

M.1.1.1. Anzucht im Gewächshaus

Alle Pflanzen wurden unter Langtagbedingungen angezogen, (16h Licht/8h Dunkel). Reichte die natürliche Tageslänge nicht aus, oder sank die Lichtintensität unter ca. 3000 lux, wurden Metall-Halid- (Halogen-) Zusatzlampen (Metalarc, Sylvania) eingesetzt. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte in Deutschland in Deutscher Einheitserde, in Californien in einer Mischung aus 1/3 Vermiculite, 1/3 Torf und 1/3 Sand. Die Pflanzen erhielten in Deutschland wöchentlich eine Stickstoff-, Kalium- und Phosphatdüngung, in Californien eine Stickstoff-, Kalium- und Phosphatdüngung alle zwei Tage, sowie eine Volldüngung incl. Spurenelementen wöchentlich. Zur Eindämmung von Infektionen wurde darauf geachtet, daß sich die Pflanzen nicht berührten.

M.1.1.2. Sterile Anzucht

Die Samen wurden 20min in einer 1%igen Natriumhypochlorit-Lösung (Endkonzentration) sterilisiert, der eine Spatelspitze eines Geschirrspülmittels zugesetzt war. Nach dreimaligem Waschen mit sterilem destilliertem Wasser wurden die Samen auf feuchter

Watte oder 1/2 MS- Medium (s. M.10.4.1.) bei 30°C im Dunkeln gekeimt. Die Keimlinge wurden nach ca. 1 Woche in Kulturgefäße auf 1/2 MS- Medium vereinzelt und unter ca. 3000lux bei 25°C bis zum 6- Blatt Stadium angezogen. Die Tageslänge betrug 16h, die Lichtquellen waren Neonröhren (in Deutschland Osram L- Fluora 35W/77R und Philips TL 65W32, in Californien ebenfalls Neonröhren ITT warm white, Westinghouse cool white sowie Agrolite F20T12/Agro).

M.1.1.3. Callusinduktion

Calluskulturen wurden entweder aus Protoplastenkulturen gewonnen (s. M.2.) oder durch Induktion von Blattmaterial. Hierzu wurden junge Blätter 20min in 0.05%iger, etwas Spülmittel enthaltender, Natriumhypochlorit- Lösung oberflächensterilisiert, dreimal in sterilem destilliertem Wasser gewaschen, in ca. 3-5mm breite Streifen geschnitten und auf MS-C-20 Medium (s. M.10.) gelegt. Nach etwa 2 Wochen hatten sich kleine Kalli entwickelt, die auf frisches MS-C-20 Medium transferiert wurden. Durch Selektion wurde nach einigen Wochen ein schnell wachsender, weicher, weißer bis weiß- gelber Callus gewonnen, der auf dem gleichen Medium alle 5-12 Tage subkultiviert wurde.

M.1.2. Hibiscus rosa-sinensis L.

M.1.2.1. Anzucht im Gewächshaus

Die Anzucht von Hibiskus- Pflanzen unbekannter Varietät (ungefüllte rote Blüten) sowie der Varietät "accra" erfolgte unter ähnlichen Bedingungen wie die Anzucht von Nicotiana. Bei Verwendung der gleichen Erdmischungen wurde nur einmal wöchentlich mit Stickstoff-, Kalium- und Phosphatdünger gedüngt. Hibiskus-Pflanzen erhielten kein Zusatzlicht.

M.1.2.2. Callusinduktion und Calluskultur

Callusinduktion und -kultur erfogten nach dem gleichen Protokoll wie für Nicotiana (M.1.1.3). Eine Calluslinie wurde von einem völlig gelben, aber noch turgeszenten Blatt gewonnen; diese Linie war ursprünglich für Untersuchungen an Gerontoplasten vorgesehen. Alle anderen Calluslinien wurden an normalen, gesunden grünen Blättern induziert.

M.2. Isolierung und Kultur von Protoplasten

M.2.1. Mesophyllprotoplasten

Für die Isolierung von Mesophyllprotoplasten wurden entweder Blätter aus sterilen Sproßkulturen benutzt oder Blätter von Gewächshauspflanzen, die gemäß M.1.1.3. sterilisiert wurden. Die Blätter wurden in ca. 1mm breite Streifen geschnitten und nach Vakuum- Infiltration 1-2h bei 30°C in der Regel in folgender Enzymlösung inkubiert: 1% Cellulase (Präparat 2230A, Röhm, Darmstadt, oder Cellulase Onozuka R10, Kinki Yakult, Nishinomiya), 0.1% Pektinase (Mazerozym R10, Kinki Yakult, Nishinomiya) und 0.1% Pektinase (PATE, Hoechst, Frankfurt) in 0.4M Mannitlösung bei pH 5.8. Die freigesetzten Protoplasten wurden von Geweberesten durch Filtration über Edelstahlsiebe von 100um Porengröße getrennt und durch Zentrifugation (50-100xg) in 0.6M Saccharoselösung von Zellen und Zelltrümmern gereinigt (dieser Schritt konnte bei einigen Präparationen ausgelassen oder durch Filtration über Wattefilter (s. M.2.2) ersetzt werden). Nach zweimaligem Waschen in 0.4M Mannitlösung wurden die isolierten Protoplasten bei einer Zelldichte von $5x10^3$ bis $1x10^4$ Zellen/ml in NT- Medium (M.10.1.1.) bei 30°C im Dunkeln kultiviert. Für einige Experimente war es notwendig, die Protoplasten zu immobilisieren. Dies wurde durch das Eingießen in 0.2-0.4%iges Agarmedium bei einer Temperatur von 37-40°C erreicht.

M.2.2. Callusprotoplasten

Für die Isolierung von Protoplasten aus Callus oder Zellsuspensionskulturen wurden Kulturen in der frühen logarithmischen Wachstumsphase verwendet, da nur diese eine hohe Ausbeute von Protoplasten garantieren. Die log- Phase war bei den verwendeten Calluskulturen etwa 5 Tage nach Transfer auf frisches Kulturmedium erreicht, bei den verwendeten Suspensionskulturen etwa 3 Tage nach Verdünnung. Suspensionskultur- Material wird im folgenden unter Callus- Material mitbehandelt.

Zur Isolierung von Protoplasten wurden weiche Callusstücke ca. 3h bei 30°C in folgender Enzymlösung inkubiert: 0.3% Cellulase (s.M.2.1.), 0.4% Driselase (Fluka, Buchs), 0.2% Pektinase (s. M.2.1.), 0.1% Cellulysin (Calbiochem- Behring, La Jolla). Die Inkubation geschah in einem Schüttelwasserbad (4cm bei 66 Auslenkungen/min.). Die freigesetzten Protoplasten konnten durch Filtration über einen Wattefilter (ca. 100mg Watte lose gestopft in einer 10 ml Spritze) von unzersetztem Gewebe und teilweise von Zellen mit unvollständig entfernter Zellwand gereinigt werden. Nach dreimaligem Waschen in einer Waschlösung (77mM $MgCl_2$, 100mM KCl, 77mM $CaCl_2$) wurden die Protoplasten in Kulturmedium überführt und bei 30°C im Dunkeln kultiviert. Die Kultur erfolgte für alle Callusprotoplasten in NT- Medium (s. M.10.), mit Ausnahme von Hibiskus- Protoplasten, für die Q- Medium (s.M.10.) verwendet wurde.

M.3. Regeneration von Pflanzen

M.3.1. Regeneration aus Callus

Von den verwendeten Arten lassen sich N. tabacum und N. plumbaginifolia regelmäßig problemlos vom Callus zur Pflanze regenerieren. Hierzu wird der am Blatt induzierte Callus auf Morphogenese- Medium (B_5 + 1.5mg/l 6-Benzylaminopurin, BAP) (s. M.10.) transferiert und bei ca. 3000lux und 25°C kultiviert. Nach einigen Wochen bilden sich Sprosse, die sich nach Transfer auf hormonfreies Medium, z.B. 1/2 MS Medium (s. M.10.), bewurzeln. Diese Pflänzchen können in Erde getopft und unter normalen Gewächshausbedingungen weiter gezogen werden.

M.3.2. Regeneration aus isolierten Protoplasten

Isolierte Protoplasten von N. tabacum und N. plumbaginifolia lassen sich ohne Schwierigkeiten über Callus zur Pflanze regenerieren. Nachdem sich kleine Calli im Protoplasten-Kulturmedium gebildet haben, werden diese in Kulturmedium von halbem osmotischem Wert überführt und von hier nach 1-2 Wochen auf festes MS-C-20 Medium transferiert. Die etwa erbsengroß gewachsenen Calli können von hier auf Morphogenese-Induktionsmedium (B_3) (s. M.10.) übertragen werden. Calli aus Protoplastenkulturen haben häufig andere hormonelle Erfordernisse zur Regeneration als Calli, die direkt aus Blattmaterial gewonnen wurden (s.o.).

M.4. Untersuchungen im Magnetfeld

M.4.1. Apparativer Aufbau

Diese Versuche wurden im Max- Planck- Institut für Festkörperforschung in Stuttgart durchgeführt. Der verwendetet Magnet (Thor Instruments, Oxford, GB) besteht aus einer supraleitenden Spule, die ein Magnetfeld von 8 T erzeugt. Der Probenraum besteht aus einer horizontalen Kupferröhre von 5 cm Durchmesser und 30 cm Länge, die auf Raumtemperatur temperiert ist. Das Magnetfeld ist homogen in einem Bereich von +/- 2cm um die Mitte und fällt auf 0.8 T an den Seiten ab. Das Maximum des Feldstärkegradienten liegt bei 6cm Entfernung von der Mitte auf beiden Seiten. Der Auf- und Abbau des Feldes geschah automatisch gesteuert linear über einen Zeitraum von je 2h.

M.4.2. Versuchsdurchführung und Auswertung

Das biologische Material, d.h. Protoplastenkulturen oder Calli, wurden in 35 mm Petrischalen in den Probenraum eingesetzt. Die Petrischalen waren so markiert, daß die Position und damit die Feldstärke, Richtung der Feldlinien und der Gradient später erkennbar waren. Aufgrund der apparativen Gegebenheiten war eine Beobachtung während des Versuches unmöglich, ebenso bestand keine Beleuchtungsmöglichkeit. Um eine etwaige Ausrichtung der eintretenden Veränderungen einer Zelle entlang der Feldlinien beobachten zu können, wurden Protoplasten in Agar immobilisiert (s. M.2.1.). Die Auswertung der Versuche erfolgte mikroskopisch bzw. fluoreszenzmikroskopisch.

M.5. Calcofluor White- Färbung

M.5.1. Versuchsdurchführung

Calcofluor White M2R (Polysciences, Warrington) (CW) wurde in Konzentrationen von 1ug/ml bis 100ug/ml entweder direkt vor der fluoreszenzmikroskopischen Beobachtung ins Medium gegeben, oder ab initio als Bestandteil des Mediums verwendet. Zur Beobachtung wurde die Filterkombination UG1/BG12/K430 (Leitz) eingesetzt. Die Beobachtung der Difluoreszenz erfolgte mit Hilfe eines Polarisationsfilters, der in den Strahlengang zwischen Objekt und Auge eingeführt wurde (s. auch Herth und Schnepf, 1980).

M.5.2. Genetische Analyse

Aus ab initio Kulturen mit 10ug/ml Calcofluor White wurden Pflanzen regeneriert (s. M.3.2.) und die zwei geselbsteten Folgegenerationen auf Samenansatz und Keimfähigkeit untersucht. Hierbei erwies sich Freilandkultur als unumgänglich, da im Gewächshaus nur schlechter Samenansatz erhalten wurde.

M.6. Laser Mikrochirurgie

M.6.1. Apparativer Aufbau

Die Laser Mikrostrahl- Anlage besteht aus einem Neodymium-YAG (Yttrium- Aluminum- Garnet) Laser mit hochenergetischen, sehr kurzen Lichtpulsen, die in den Epifluoreszenz- Lichteingang eines Zeiss Axiomat Mikroskopes geleitet werden (s. auch Berns et al., 1981). Im Strahlengang befinden sich diverse Einrichtungen zur Modifikation der Wellenlänge und der Energie. Es stehen 266nm, 355nm, 532nm und 1064nm zur Verfügung. In diesen Versuchen wurde Licht von 266nm Wellenlänge und 11.3 uJ/Puls Energie bei einer

Pulsdauer von 15nsec verwendet. Durch das Epifluoreszenz- Konzept wird der Durchmesser des Lichtflecks durch das Auflösungsvermögen des verwendeten Objektives bestimmt, wobei der eigentlich wirksame Bereich ("hot spot") in Abhängigkeit von der verwendeten Energie wesentlich kleiner ist als der Durchmesser des Lichtfleckes. Das verwendete Objektiv (Zeiss Ultrafluar 32x) fokussiert den Laserstrahl auf einen Punkt von ca. 3um Durchmesser. Wegen der Verwendung von ultraviolettem Licht ist es erforderlich, daß die optischen Teile des Mikroskopes sowie das Deckglas aus Quarz bestehen, was sich negativ auf die optische Qualität auswirkt.

M.6.2. Kulturkammer

Da es sich bei den Bestrahlungsexperimenten um relativ langfristige Versuche handelte, war es nötig, eine Kulturkammer zu entwickeln, die den eingeschlossenen Protoplasten eine normale Entwicklung ermöglicht bei gleichzeitiger Erfüllung aller Anforderungen, die durch das mikroskopische System gestellt werden. Das entwickelte System besteht aus einem Quarz- Deckglas, einer Dichtung aus Silikonfett und einem Polystyrol- Deckglas mit relativ guter Sauerstoffdurchlässigkeit. Das Gesamtvolumen dieser Kammern beträgt 10-40ul. Trotz des Polystyrol- Deckglases ist es wichtig, daß einige kleine Luftblasen eingeschlossen werden. Unter diesen Bedingungen sind Protoplasten in der Lage, sich zumindest bis zum 3- Zell- Stadium zu entwickeln. Falls notwendig, können die Zellen in Agar eingegossen werden, ohne die Teilungsrate zu beeinträchtigen.

M.6.3. Video- Cinematographie und elektronische Bild-Verwertung

An das verwendete Mikroskop war eine hochauflösende Video-Kamera (Sierra LST1) angeschlossen, die über einen DeAnza IP5000 Image Array Processor mit einem Video Cassettengerät (Sony TVO 9000) verbunden war. Mit dieser Anordnung wurden Zeitraffer-Aufnahmen der Experimente gemacht und interessante Ausschnitte als stehende Bilder mit verbessertem Kontrast oder als Pseudo-Interferenz- Kontrast Bild auf dem Bildschirm betrachtet. Hierzu wurde bestehende Software benutzt. Das Filmmaterial befindet sich bei Dr. F. Hoffmann an der University of California Irvine.

M.6.4. Versuchsdurchführung und Auswertung

Frisch isolierte Protoplasten wurden in die beschriebenen Kulturkammern (M.6.2.) eingeschlossen und die Temperatur auf der Mikroskopbühne durch ein Thermostat- geregeltes Warmluftgebläse auch über Nacht konstant gehalten, was insbesondere wegen der Fokussierung notwendig war. Die Auswahl der Zellen geschah nach Eignung der Cytoplasmastränge. Die Anordnung erlaubt präzises Zielen mit Hilfe eines Fadenkreuzes im Okular bzw. auf dem Video-Bildschirm. Die Zellen konnten vor, während und nach dem Schuß beobachtet und mit der Videoanlage aufgenommen werden. In einigen Fällen wurden Photographien direkt vom Objekt angefertigt.

M.6.5. Fusion mittels Laser- Mikrostrahl

Die hier verwendete Methode wurde völlig neu erarbeitet und ist in E.4. beschrieben.

M.7. Untersuchungen mit Hemmstoffen und Vitalfarbstoffen

M.7.1. Cytochalasin B

Cytochalasin B (Aldrich, Milwaukee) wurde in einer Konzentration von 10ug/ml Kulturmedium eingesetzt. Die Endkonzentration wurde durch Verdünnen einer sterilen Stammlösung von 1mg/ml Cytochalasin B in Dimethylsulfoxid (DMSO) gewonnen. Das hieraus resultierende DMSO im Medium (1%) ist für keinen der beobachteten Effekte verantwortlich, wie in Kontrollexperimenten festgestellt wurde. In Reversionsexperimenten wurden die Zellen dreimal in 10-fachen Volumina cytochalasinfreien Mediums gewaschen.

M.7.2. Colchicin

Colchicin (Sigma Chemical Co., St. Louis) wurde aus einer sterilfiltrierten Stammlösung von 100mM in Kulturmedium auf eine Endkonzentration von 1mM verdünnt. Die Stammlösung wurde im Dunkeln aufbewahrt, um die Zersetzung zu Lumicolchicin zu vermeiden.

M.7.3. Taxol

Taxol (National Cancer Institute, Bethesda) wurde aus Stammlösungen von 10mM bzw. 100uM in DMSO (steril) auf Endkonzentrationen von 0,1mM bis 0,1uM in Kulturmedium verdünnt.

M.7.4. Glycerin

Glycerin (analytical grade, Malinckrodt, Paris, Kentucky) wurde ohne zusätzliche Sterilisation in Konzentrationen von 0.1-1M eingesetzt, ohne Verwendung von Stammlösungen.

M.7.5. Deuteriumoxid

Deuteriumoxid (99,8%, Sigma Chemical Co., St. Louis) wurde in Konzentrationen von 50-100% eingesetzt. Hierzu wurde Medium lyophilisiert, in D_2O aufgenommen und sterilfiltriert. Als Kontrolle wurde Medium lyophilisiert, in H_2O aufgenommen und ebenfalls sterilfiltriert. Hierbei konnte kein lyophilisationsbedingter Effekt beobachtet werden.

M.7.6. Ionophor A23187

Ionophor A23187 (Sigma Chemical Co., St. Louis) wurde aus einer 10mM Stammlösung in DMSO (steril) auf eine Endkonzentration von 10-50uM verdünnt (Pressman und Fahim, 1982), was einer Endkonzentration von 0.1-0.5% DMSO entspricht.

M.7.7. Trypanblau

Trypanblau wurde aus einer 0.4%igen Stammlösung in Medium bei einer Endkonzentration von 0.2% verwendet.

M.7.8. Lucifergelb

Die Stammlösung von Lucifergelb war 5%ig in DMSO. Sie wurde auf eine Endkonzentration von 0.005% verdünnt, was einer DMSO-Endkonzentration von 0.1% entspricht. Die Fluoreszenz von Lucifergelb konnte mit der Filterkombination für CW (M.5.1.) beobachtet werden.

M.8. Elektronenmikroskopie und Seriendünnschnitte

M.8.1. Fixierung von Protoplasten

Isolierte Protoplasten sind aufgrund ihrer prominenten Vakuole besonders anfällig für artefizielle Verzerrungen während der Vorbereitung für die Elektronenmikroskopie. Daher wurde die folgende, sehr schonende Methode verwendet, die im wesentlichen den Prozeduren folgt, wie sie von Fowke (1975) und Liaw und Berns (1981) beschrieben wurden. Protoplasten, die mit dieser Methode fixiert wurden, zeigten lichtmikroskopisch keine Strukturveränderungen gegenüber lebenden Protoplasten. Eine Protoplastensuspension in Medium wurde mit einer 3%igen Glutaraldehydlösung in Medium versetzt, bis eine Endkonzentration von 1% erreicht war und nach vorsichtigem Schütteln 2h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde 2h lang bei Raumtemperatur mit 3% Glutaraldehyd inkubiert. Nach kurzem Waschen (Zentrifugation bei 50xg) in Kulturmedium wurden die Protoplasten in 50mM Natriumphosphatpuffer überführt (pH 6,8), auf Eis gegeben, und der Puffer während 3h fünfmal gewechselt. Alle weiteren Schritte bis zur Einbettung in Epon erfolgten im Eisbad. Die Nachfixierung der Protoplasten geschah über Nacht in 1% Osmiumtetroxid in obigem Natriumphosphatpuffer. Anschließend wurde über einen Zeitraum von 30min zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Überführung in absoluten Äthanol geschah in 10%-Schritten, jeweils 15min pro Wechsel. Über Nacht wurde dreimal mit absolutem Äthanol gewaschen, anschließend der Überstand weitgehend dekantiert und über einen Zeitraum von 6h tropfenweise Propylenoxid zugegeben bis zu einem Verhältnis Propylenoxid:Äthanol = 2:1. Die nun folgenden Schritte erfolgten wieder bei Raumtemperatur. Nach zweimaligem Waschen mit Propylenoxid wurde über 6h eine genügende Menge eines Gemisches

von Propylenoxid und Epon 812 (Gemisch von 27ml Epon 812, 10ml Dodecentylsäureanhydrid, 13ml Nadic-methyl anhydrid und 1ml Dimethylaminoäthylphenol) zugegeben, daß die Protoplasten nach Entfernen des Propylenoxids von Epon bedeckt waren. Um das Propylenoxid langsam zu entfernen, wurde das Reagenzglas mit fein durchlöcherter Aluminiumfolie abgedeckt und über Nacht stehen gelassen. Mit zusätzlichem 100%igem Epon wurden die Zellen anschließend auf einem Deckglas (45x50mm) in einer dünnen Schicht aufgetragen. Nach mehreren Wochen Trocknung im Vakuumofen bei 60°C konnten die Deckgläser in flüssigem Stickstoff abgesprengt werden. In einigen Fällen war dies wegen der ungenügenden Härte des Kunststoffes unmöglich, weshalb Fluorwasserstoffsäure zur Entfernung der Deckgläser eingesetzt wurde.

Für die Elektronenmikroskopie wurden kleine Stücke Epon mit eingebetteten Zellen ausgeschnitten und Ultradünnschnitte (hellgolden bis silbern, 60-80nm) angefertigt. Diese Schnitte wurden mit einer Lösung von 10% Uranylacetat in absolutem Methanol nachgefärbt und unter einem Elektronenmikroskop, Philips EM 300, bei 80kV untersucht.

Für die Präparation der Serienschnitte für die lichtmikroskopische Untersuchung wurden ebenfalls kleine Stücke Epon ausgeschnitten und 0,5um Schnitte (grün bis rot) angefertigt. Hierbei wurde auf Vollzähligkeit der Schnitte und Einbehaltung der Reihenfolge großer Wert gelegt, wobei die Reihenfolge auch an der Größe der Schnitte (sie stammen aus einem Kegelstumpf) abgeschätzt werden konnte. Die Schnitte wurden mit einer Lösung aus 1% Azure II (Aldrich, Milwaukee, Wiskonsin) und 1% Methylenblau (Eastman Kodak, Rochester, New York) in 1%iger Borax- Lösung gefärbt.

M.8.2. Dreidimensionale Rekonstruktion eines Protoplasten

Die Dünnschnitte wurden photographiert, die Bilder vergrößert und von Hand auf durchsichtige Plastikfolien übertragen. Unter

sorgfältiger Ausrichtung der einzelnen Schnitte aufeinander wurden die Folien übereinandergelegt (s. Abb. 9) und nach den auf diese Weise gewonnenen Informationen ein Zellmodell gezeichnet.

M.9. Immunfluoreszenz

M.9.1. Antikörper

Als primäre Antikörper wurden Antikörper gegen ß- Tubulin aus Suspensionskulturen von Paul's Scarlet Rose verwendet, die von Morejohn et al. (1984) isoliert und charakterisiert wurden. Antikörper gegen Rinderhirn- Tubulin, die nach der Methode von Fuller et al. (1975) isoliert und von M.W. Berns zur Verfügung gestellt wurden, wiesen keine spezifische Affinität gegen Hibiskus- Mikrotubuli auf. Beide Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:20 in MSB (s. M.9.2.) eingesetzt.

Affinitätsgereinigte sekundäre Antikörper (Ziege gegen Kaninchen- Immunglobulin G, Fluorescein- konjugiert, Sigma Chemical Co., St. Louis) wurden in einer Verdünnung von 1:50 eingesetzt.

M.9.2. Versuchsdurchführung und Auswertung

Die Immunfluoreszenz- Prozedur orientiert sich mit einigen Modifikationen an der von Lloyd et al. (1979) beschriebenen. Ähnlich wie von diesen Autoren beobachtet, wiesen auch in meinen Experimenten Zellen, die vor der Permeabilisierung fixiert wurden, eine zu hohe Hintergrundfluoreszenz auf, die spezifische Strukturen völlig verdeckte. Deswegen wurde auf die Präparation von "Membrane- Ghosts" zurückgegriffen (s.u.).

Die zu untersuchenden Protoplasten wurden auf Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläser angeheftet (Mazia et al., 1974). Dazu

wurden die Deckgläser nach sorgfältiger Reinigung in 95% Äthanol (Acetonreinigung resultierte in ungenügender Anheftung) kurz in eine 1mg/ml Lösung Poly-L-Lysin (MW 100000, Sigma Chemical Co., St. Louis) getaucht und an der Luft getrocknet. Sie waren dann einige Wochen lang verwendbar.

200ul Protoplasten- Suspension wurde auf ein Deckglas gegeben und zur Anheftung der Zellen 20min stehen gelassen, dann 20min mit Mikrotubuli stabilisierendem Puffer (MSB, s.u.) mit 1% Triton X-100 (Fisher Scientific Co., Fair Lawn) und 10mg/ml Rinderserumalbumin (globulinfrei, Sigma Chemical Co., St. Louis) extrahiert. Sodann wurden die Triton- unlöslichen Strukturen 20min mit MSB+3,5% Formaldehyd+10mg/ml Rinderserumalbumin fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit MSB wurde 45min mit primärem Antikörper behandelt (40ul), anschließend dreimal mit MSB gewaschen. Nach 45 minütiger Behandlung mit sekundärem Antikörper wurde dreimal mit MSB gewaschen. Schließlich wurden die Deckgläser mittels "Aquamount" (Lerner Laboratories, New Haven) auf Objektträger montiert und luftgetrocknet. Die Wasch- und Fixierungsschritte wurden in einem Färbebehälter durchgeführt, die Anheftung der Zellen und die Antikörperbehandlungen auf waagrechten Deckgläsern in feuchten Kammern.

Die Immunfluoreszenz- Präparate wurden mittels Epifluoreszenz unter Verwendung der Standardfilter (Zeiss) für Fluorescein (Bandfilter 450-490 nm, halbdurchlässiger Spiegel mit Grenzwellenlänge 510 nm, Langpaßfilter 520 nm) beobachtet.

Da sich bei Immunanfärbungen unspezifische Bindungen nicht ausschließen lassen, wurden für jeden Zelltyp folgende Kontrollversuche durchgeführt:

1. eine Präparation, in der der primäre Antikörper durch MSB ersetzt wurde (dies gibt Aufschluß über Unspezifitäten in der Bindung des sekundären Antikörpers).

2. eine Präparation, in der der primäre Antikörper durch hitzeinaktiviertes Serum eines nicht immunisierten Kaninchens (pre-immun serum) ersetzt wurde (dies gibt Aufschluß über

Unspezifitäten, die im Serum außer dem gewünschten Antikörper vorhanden sind).

Als wesentlich erweist sich die korrekte Wahl des Rinderserumalbumins: falls dieses mit Globulinen verunreinigt ist, ergibt sich eine hohe Hintergrundfluoreszenz durch Bindung des Anti- Immunglobulins G an diese Globuline.

Zusammensetzung des Mikrotubuli stabilisierenden Puffers (MSB):

$MgSO_4$	1mM
EGTA	2mM
PIPES	100mM
Mannit	400mM
NaN_3	0.1%
pH 6.9	

(EGTA = Ethyleneglycol-bis- (-aminoethylether) N,N'-tetraacetic acid, Sigma Chemical Co., St. Louis)

(PIPES = Piperazine- N,N' -bis- (2-ethane- sulfonic acid), Sigma Chemical Co., St. Louis)

M.10. Kulturmedien

M.10.1. Protoplastenkultur

M.10.1.1. NT- Medium

Medium nach Nagata und Takebe (1971).

NH_4NO_3	825	
KNO_3	950	
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	220	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1233	
KH_2PO_4	680	
Na EDTA	37.3	
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27.8	
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	22.3	
H_3BO_3	6.2	
$ZnSO_4 \cdot 4H_2O$	8.6	
KJ	0.83	
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.25	
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.025	
$CoSO_4 \cdot 7H_2O$	0.030	
Saccharose	10000	
meso- Inosit	100	
Thiamin·HCl	1	
1- Naphthalin- Essigsäure	3	
6- Benzylamino- purin	1	
D- Mannit	72800	(≈0.4M)
pH	5.8	

M.10.1.2. Q- Medium

NH_4NO_3	180	
KNO_3	1515	
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	220	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	984	
NaH_2PO_4	69	
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27.85	
Na_2EDTA	37.25	
$MnSO_4 \cdot H_2O$	10	
H_3BO_3	3	
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	2	
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.25	
KJ	0.75	
$CuSO_4$	0.025	
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.025	
meso- Inosit	100	
Pyridoxin·HCl	1	
Thiamin·2HCl	1	
Nicotinsäure	1	
Biotin	0.01	
Ca- Pantothenat	1	
Casein- Hydrolysat (säurehydrolysiert, Nutritional Biochemicals Corp., Cleveland)	300	
Glutamin	134	
Glycin	75	
Saccharose	250	
Glucose	10800	(=0.6M)
2,4- Dichlorphenoxy- Essigsäure	0.2	
6- Benzylamino- purin	0.5	
1- Naphthalin- Essigsäure	1	
Cocosnußwasser (von frischen Nüssen)	20 ml/l	
pH	5.6	

M.10.2. Calluskultur

M.10.2.1. MS-C-20- Medium

Modifiziertes Medium nach Murashige und Skoog (1962).

	mg/l
NH_4NO_3	1650
KNO_3	1900
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	440
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370
KH_2PO_4	170
$FeSO_4$	27.8
Na EDTA	37.3
H_3BO_3	6.2
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	22.3
$ZnSO_4 \cdot 4H_2O$	8.6
KJ	0.83
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.25
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.25
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.25
meso- Inosit	100
Thiamin·2HCl	10
Nicotinsäure	1
Pyridoxin·HCl	1
Saccharose	30000
Agar	7300
2,4- Dichlorphenoxy- Essigsäure	1
1- Naphthalin- Essigsäure	0.2
6- Benzylamino- purin	0.2
pH	5.6

M.10.2.2. MG- Medium

Medium nach Müller und Grafe (1978)

Weitere anorganische Salze wie in MS-C-20 Medium.

	mg/l
$CuSO_4 \cdot 2H_2O$	0.025
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.025
meso- Inosit	20
Nicotinsäure	0.5
Pyridoxin·HCl	0.1
Thiamin·2HCl	0.4
Saccharose	20000
Agar	7300
2,4- Dichlorphenoxy- Essigsäure	1
Kinetin	0.2
Gibberellinsäure	0.1
pH	5.8

M.10.3. Morphogenese- Induktion

M.10.3.1. B_5+1.5mg/l BAP

Medium nach Gamborg et al. (1968).

	mg/l
KNO_3	3000
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	500
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	150
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	150
$(NH_4)_2SO_4$	134
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27.8
Na_2EDTA	37.3

$MnSO_4 \cdot H_2O$	10
H_3BO_3	3
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	2
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.25
KJ	0.75
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.025
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.025
meso- Inosit	100
Thiamin·2HCl	1
Pyridoxin·HCl	1
Nicotinsäure	1
Saccharose	30000
Agar	7300
6- Benzylamino- purin	1.5
pH	5.5

M.10.3.2. B_3 - Medium

Modifiziert nach Murashige und Skoog (1962)

Anorganische Salze wie in MG- Medium.

	mg/l
meso- Inosit	100
Pyridoxin·HCl	0.5
Nicotinsäure	0.5
Glycin	2
Saccharose	10000
Agar	7300
Indolylessigsäure	4
Kinetin	2.5
pH	5.8

M.10.4. Sproßkultur

M.10.4.1. 1/2 MS- Medium

Weitere anorganische Salze in halber Konzentration wie in MS-C-20 Medium.

	mg/l
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
$CoCl_2.6H_2O$	0.025
Glycin	1
Nicotinsäure	0.25
Pyridoxin·HCl	0.25
meso- Inosit	50
Saccharose	5000
Agar	10000
pH	5.7

ERGEBNISSE

E.1. Untersuchungen im Magnetfeld

E.1.1. Protoplasten

Pflanzen, Pflanzenzellen und pflanzliche Organelle sind von Magnetfeldern beeinflußbar. So können z.B. Wurzeln in Richtung der Magnetfeldlinien wachsen, und Chloroplasten richten sich gemäß dem Magnetfeld aus (Audus und Wish, 1964; Papp und Meszena, 1982). Daher sollte untersucht werden, ob starke magnetische Felder (8T, das geomagnetische Feld beträgt dem gegenüber nur 10^{-4} T) ausgenutzt werden können, um Polarisationen in isolierten Protoplasten oder in Calluszellen im Gewebeverband zu induzieren und so Einfluß auf morphogenetische Entwicklungen zu nehmen.

Bei den Versuchen im Starkfeld- Magneten in Stuttgart wurden Mesophyllprotoplasten von Nicotiana tabacum und N. plumbaginifolia sowie Callusprotoplasten von N. plumbaginifolia und Suspensionkultur- Protoplasten von Glycine max untersucht. Um eventuelle Transporteffekte auszuschließen, wurden Protoplasten sowohl in Ladenburg hergestellt und nach Stuttgart transportiert, als auch dort an Ort und Stelle hergestellt und jeweils unverzüglich in das Magnetfeld eingebracht. Es konnten keine Unterschiede zwischen den jeweiligen Parallelkulturen beobachtet werden.

Die Protoplasten blieben 3-5 Tage im Magneten, um sicherzustellen, daß die ersten Teilungen erfolgt waren. Sie wurden unmittelbar nach dem Abbau des Magnetfeldes ausgewertet. Eine dauerhafte, durch das Magnetfeld bedingte, Polarisierung der Protoplasten konnte nicht festgestellt werden. Dennoch wurden einige interessante Beobachtungen gemacht. Diese Phänomeme traten sowohl im homogenen als auch im inhomogenen Feld auf und waren überwiegend negativer Art: eine geringere Teilungsrate und ein

höherer Anteil an toten Zellen. Eine weitere Beobachtung war z.B. die Ansammlung von Plastiden an entgegengesetzten Polen der Zelle mit Ausrichtung entsprechend dem Magnetfeld. Bei keiner dieser Zellen wurde eine Zellteilung beobachtet. In Agar eingegossene Protoplasten schienen anfälliger für zerstörerische Effekte des Magnetfeldes zu sein als Kontrollkulturen, die außerhalb des Magneten kultiviert wurden, denn in immobilisierten Kulturen, die dem Magnetfeld ausgesetzt wurden, wurden deutlich weniger Teilungen beobachtet. Dagegen war die Teilungsrate in den Flüssigkulturen etwa gleich hoch in Proben- und Kontrollkulturen, vorausgesetzt, der Auf- und Abbau des Magnetfeldes ging ohne Zwischenfälle (wie z.B. plötzlicher Zusammenbruch des Magnetfeldes) vonstatten. Ein Zusammenbruch des Feldes resultiert unweigerlich in einem Platzen sämtlicher Protoplasten, vermutlich wegen der auftretenden hohen diamagnetischen Kräfte.

Ein Einfluß des Magnetfeldes auf die Ausrichtung der Teilungsebene konnte nicht beobachtet werden. Teilungen wurden sowohl in Kontrollkulturen außerhalb des Magnetfeldes als auch in Kulturen, die während der gesamten Zeit nach der Isolierung dem Magnetfeld ausgesetzt waren, mit der gleichen Häufigkeit in allen Ebenen beobachtet.

In einigen Versuchen wurden immobilisierte Protoplasten verwendet, in deren Medium ab initio Calcofluor White (CW) (10ug/ml) enthalten war (s. E.2.1.). Das Ziel war, eine eventuelle Abhängigkeit der Topographie der Zellwandsynthese vom Magnetfeld zu erfassen. Auch in diesem Fall ergab sich keine Abhängigkeit vom Magnetfeld.

Die Versuche konnten wegen des Umzuges nach Kalifornien nicht konsequent beendet werden. Über die vorliegenden Ergebnisse läßt sich zusammenfassend feststellen, daß sowohl starke homogene als auch starke inhomogene Magnetfelder auf Protoplastenkulturen der untersuchten Typen weder einen erkennbaren polarisierenden Effekt noch einen deutlichen negativen Effekt ausüben, wenn von der durch experimentelle Unzulänglichkeiten verursachten "mechanischen"

Zerstörung durch diamagnetische Kräfte abgesehen wird.

E.1.2. Morphogenese

Ein ähnliches Bild wie bei den Protoplasten ergibt sich in den Versuchen, Einfluß auf die morphogenetischen Vorgänge in Calluskulturen von N. tabacum zu nehmen. Ein zusätzliches Problem ergibt sich daraus, daß eine notwendige Voraussetzung für optimale morphogenetische Entwicklung von Calluskulturen eine adäquate Beleuchtung ist, die nicht simultan mit dem Magnetfeld geboten werden konnte. Deshalb wurden die Calli unter der Annahme, daß determinierende Vorgänge in frühen Entwicklungsphasen stattfinden, eine Woche im Magnetfeld belassen und dann unter Standardbedingungen weiterkultiviert. In diesem Versuchsansatz zeigten sich keine Unterschiede zu den Kontrollkulturen. Es war weder die Frequenz noch die Topographie der Knospen- und Blattbildung beeinflußt. Ein Regenerat wurde bis zur Pflanze kultiviert. Diese Pflanze wies eine normale Morphologie auf.

Auch in diesem Fall läßt sich zusammenfassend feststellen, daß das Magnetfeld keinen, auch keinen negativen, Effekt auf die Entwicklung des eingebrachten Pflanzenmaterials ausübte.

E.2. Zellwandbildung in Protoplastenkulturen

E.2.1. Calcofluor White als Vitalfarbstoff

Obwohl optische Aufheller, zu denen auch Calcofluor White (CW) gerechnet wird, schon seit längerer Zeit für biologische Untersuchungen verwendet worden sind (Darken, 1961), war die Verwendung von CW in pflanzlichen Protoplastenkulturen ab initio bislang unbekannt.

Da es im Zusammenhang mit der Untersuchung von magnetischen Feldeinflüssen auf die Entwicklung von Protoplasten wünschenswert war, mit einer einfachen Technik in vivo die Zellwandbildung beobachten zu können, wurde zunächst eine Reihe von Farbstoffkonzentrationen auf ihre Sichtbarkeit und ihre biologische Wirkung hin untersucht (s. auch Tab. 1). Die niedrigste Konzentration, bei der eine gut entwickelte Zellwand gerade noch erkennbar fluoresziert, wurde bei 1ng CW/ml Kulturmedium gefunden. Eine gut erkennbare Fluoreszenz in Gegenwart nennenswerten Zellwandmaterials erforderte bereits 100ng CW/ml. Um frühe Entwicklungsstadien zuverlässig beobachten zu können, war eine Minimalkonzentration von 500ng/ml- 1ug/ml notwendig. Diese Konzentrationen sind weitgehend unabhängig vom verwendeten Zelltyp (Callusprotoplast oder Mesophyllprotoplast) und ebenfalls unabhängig von der Artzugehörigkeit der Zellen. Untersucht wurden in diesem Zusammenhang Mesophyllprotoplasten von N. tabacum und N. plumbaginifolia, sowie Callusprotoplasten von N. plumbaginifolia, Brachycome dichromosomatica und Protoplasten aus einer Zellsuspensionskultur von Glycine max. Obwohl CW in anderen Systemen als ungiftig bezeichnet wird (z.B. 2mg/ml in Poterioochromonas, Herth 1980), wurde in allen untersuchten Protoplastenkulturen eine Letalität (LD 100) von Konzentrationen über 100ug/ml gefunden.

E.2.2. Difluoreszenz von Calcofluor White gefärbtem Zellwandmaterial

Durch die Anisotropie des CW- Moleküls ist das emittierte Fluoreszenzlicht polarisiert (Difluoreszenz, s. auch Herth und Schnepf, 1980). Dies kann jedoch nur dann makroskopisch sichtbar werden, wenn alle Moleküle eine ähnliche Orientierung aufweisen, wie dies bei der Bindung an kristalline Zellulosefibrillen der Fall ist. Weisen die Zellulose- Einheiten dagegen eine mehr amorphe Struktur auf, ist für die gebundenen CW- Moleküle eine

Tabelle 1

Pflanzen-Art	Protoplasten-Typ	niedrigste sichtbare CW- Konz. (ng/ml)	letale CW- Konz. (ug/ml)	Entwicklung bis
N. tabacum	Mesophyll	1	über 100	zur Pflanze
N. plumbaginifolia	Mesophyll	1	über 100	zum Callus (1)
N. plumbaginifolia	Callus	1	über 100	zum Callus (1)
B. dichromosoatica	Callus	1	über 100	zum Callus (2)
G. max	Susp. Kultur	1	über 100	zum Callus (2)

(1) Regeneration zur Pflanze nicht versucht.
(2) Regeneration zur Pflanze auch in Kontrollkulturen nicht möglich.

Tabelle 1. Entwicklung isolierter Protoplasten verschiedener Arten in Gegenwart von Calcofluor White.

jeweils unterschiedliche Orientierung zu erwarten und dadurch bedingt eine weniger ausgeprägte bzw. keine Difluoreszenz.

Diese Eigenschaften des Fluoreszenz- Systems wurden ausgenutzt, um anhand der Polarisations- Charakteristik des Fluoreszenzlichtes Rückschlüsse auf den Zustand der frisch synthetisierten Zellulose zu ziehen. Das Zellwandmaterial in Kontrollkulturen, bei denen CW unmittelbar vor der Untersuchung zugesetzt wurde, zeigte ausgeprägte Difluoreszenz, mit Ausnahme solcher Strukturen, die als Mißbildungen anzusehen sind (s. E.2.3.). Dagegen sind die lockeren Strukturen (E.2.3.), die bevorzugt in Anwesenheit von CW gebildet werden, mit zunehmender CW- Konzentration immer weniger stark difluoreszierend. Nach einigen Teilungen zeigten dann wieder alle Zellen Difluoreszenz.

Auf Grund der apparativen Gegebenheiten war es nicht möglich, photographische Aufnahmen der Difluoreszenz zu machen, da keines der verwendeten Mikroskope die Möglichkeit bot, einen Polarisationsfilter zwischen Probe und Kameraausgang einzuführen.

E.2.3. Beobachtung der Zellwandbildung in ab initio gefärbten lebenden Protoplastenkulturen

Die folgende detaillierte Beschreibung bezieht sich auf Mesophyll- Protoplasten aus N. tabacum- Sproßkulturen. Die verwendeten Blätter waren noch sehr jung (ca. 2-3cm), ein Umstand, der die beobachteten kurzen Dedifferenzierungszeiten erklärt. Qualitativ gelten die hier geschilderten Beobachtungen auch für die anderen untersuchten Zelltypen (s. E.2.2.). Das Kulturmedium enthielt im Standardfall 10ug CW/ml. Abweichungen hiervon sind gesondert erwähnt.

Direkt nach der Isolierung wiesen die Protoplasten keinerlei CW- Fluoreszenz auf, ausschließlich die rote Chlorophyll- Autofluoreszenz war sichtbar. Bereits nach einer Stunde war bei einigen Protoplasten ein kleiner, blau fluoreszierender Punkt erkennbar (s. Abb. 1.A). Mit zunehmender Kulturdauer nahm auch die

Abbildung 1

Tabak Mesophyll- Protoplasten, in Gegenwart von 10ug/ml Calcofluor White kultiviert. Die einzelnen Bilder zeigen verschiedene Zellen. (Balken: 50um)

(A) Ein einzelner fluoreszierender Punkt stellt den Anfang der Zellwandsynthese dar. Dieser Punkt ist auch im Hellfeld sichtbar. Der Bildeinsatz zeigt die Position auf dem Protoplasten und die Größenverhältnisse im Hellfeld.

(B) Ausbreitung des Zellwandmaterials über die Zelloberfläche.

(C) Weitere Ausbreitung.

(D) Protoplast, vollständig mit Calcofluor- positivem Material bedeckt.

(E) Beginnende Cytokinese (neu gebildetes Material scheint stärker zu fluoreszieren als älteres; der Blickwinkel ist entlang der Ebene der sich neu bildenden Zellwand).

(F) Vollendete Teilung.

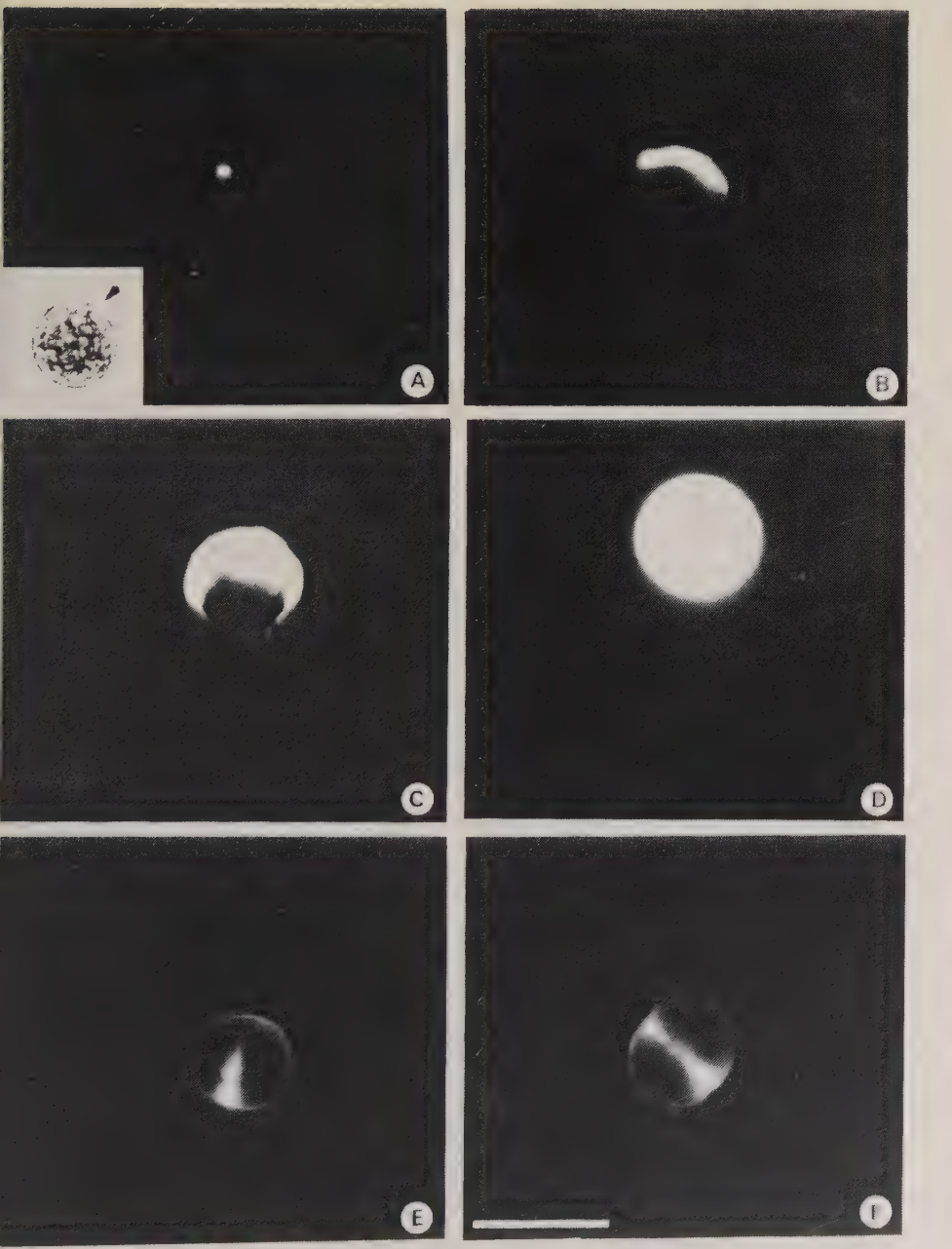
(G) Mißbildung: bandartige Struktur steht von der Oberfläche ab, wahrscheinlich wird Zellwandmaterial in das Medium ausgeschieden.

(H) Mißbildung: spiralige Struktur steht von der Oberfläche ab (beobachtet in einer Kontrollkultur, der Calcofluor White erst unmittelbar vor der Färbung zugesetzt wurde).

(I, K) Mißbildungen: weitere Beispiele von Ausscheidung des Zellwandmaterials in das Medium.

(L) Mißbildung: neugebildetes Zellwandmaterial breitet sich nicht über die Oberfläche aus, sondern bildet Klumpen. Mehrere Startpunkte der Zellwandbildung werden häufig beobachtet.

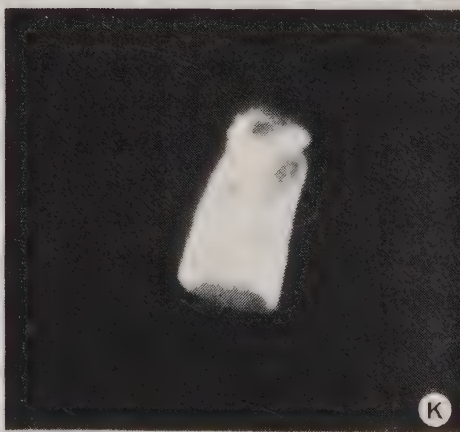
(M) Junger Callus.

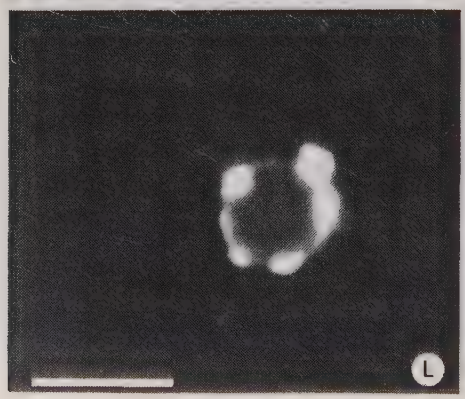

A
B
C
D
E
F

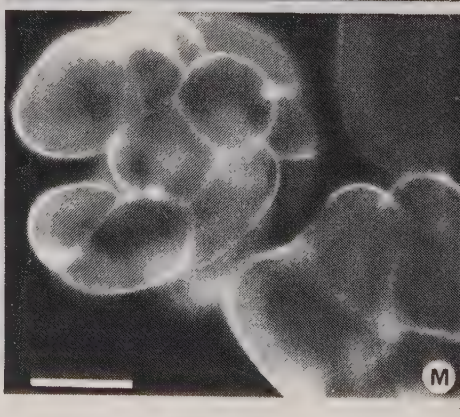
G

H

I


K


L


M

Anzahl der Protoplasten zu, die diesen Punkt aufwiesen. Einige Protoplasten zeigten mehrere solcher Punkte, die aber immer den Charakter von diskreten fluoreszierenden Stellen hatten. Nach 4-8h Kulturdauer nahm die Zahl der fluoreszierenden Punkte ab zugunsten von großflächigeren fluoreszierenden Kappen (Abb. 1.B,C,D). Das Verhältnis der einzelnen Strukturen zueinander verschob sich in Abhängigkeit vom Kulturalter zugunsten größerer fluoreszierender Flächen. Nach 24-48h überwogen geteilte bzw. in Teilung begriffene Zellen (Abb. 1.E,F). Die soeben beschriebene Entwicklung kann als die normale Entwicklung eines sich teilenden Protoplasten angesehen werden. Daneben konnten zahlreiche Fälle von Mißbildungen beobachtet werden, bei denen das synthetisierte Material sich nicht auf der Protoplastenoberfläche verteilte, sondern entweder als Klumpen ansammelte (Abb. 1.L) oder sogar in Form von Strängen oder Bändern in das Kulturmedium abgeschieden wurde (Abb. 1.G,H). In wenigen Fällen geschah die Exkretion in das Medium großflächig und resultierte in wolkenähnlichen Gebilden (Abb. 1.I,K). Alle Beobachtungen deuten darauf hin, daß diese Zellen nach kurzer Zeit absterben, da keines dieser Gebilde jemals mit einer geteilten Zelle assoziiert gesehen wurde, sondern vielmehr häufig mit kollabierten (= toten) Zellen.

Kontrollkulturen, die erst unmittelbar vor der Beobachtung angefärbt wurden, zeigten die Zellen in jeweils ähnlichen Stadien. Das Erscheinungsbild der Fluoreszenz war jedoch geringfügig anders: Die fluoreszierenden Strukturen erschienen in Kontrollkulturen kompakter. Insbesondere unter den Mißbildungen fielen einige durch einen hohen Grad an Organisation des in das Medium abgeschiedenen Materials auf (Abb. 1.H).

Wann immer geteilte Zellen beobachtet wurden, waren diese von einer vollständigen Hülle fluoreszierenden Materials umgeben (Abb. 1.M). In dieser Hinsicht schien es irrelevant zu sein, ob dieses Material amorphen oder kristallinen Charakter hatte. Dagegen gingen Zellen, die keine oder keine vollständige Hülle erzeugen konnten, früher oder später zugrunde, ohne sich zu teilen.

Bezüglich der Zahl der Teilungen und des Verhältnisses der Mißbildungen zu normalen Entwicklungsstadien wurde kein Unterschied zwischen Kontrollen und CW- behandelten Kulturen beobachtet. CW scheint keinen negativen Effekt auf die Teilungsrate auszuüben. Dagegen wurden große Unterschiede dieser Art zwischen einzelnen Präparationen gefunden. Der Verlauf einer jeden Aufarbeitung und sogar das "Mikroklima" um jede einzelne Kulturschale scheinen einen großen Einfluß auf die Qualität der Protoplasten zu haben. Zahlenangaben aus Einzelexperimenten haben daher nur eine geringe Aussagekraft. Deshalb wurden in allen folgenden Experimenten die Ergebnisse in Prozent- Bereichen angegeben, die sich aus mehreren wiederholten Experimenten der gleichen Art ergaben.

Um einige Informationen über die chemische Identität des fluoreszierenden Materials zu gewinnen, wurden die Protoplasten a) direkt, b) 6h , c) 24h nach der Isolierung mit Cellulase (0.1%) bzw. Pektinase (0.1%) behandelt. In allen Fällen entfernte Cellulase das fluoreszierende Material vollständig innerhalb von 4h bzw. verhinderte seine Bildung, während Pektinase auch nach 24stündiger Inkubation keinen Effekt zeigte. Wider Erwarten wurde auch das fluoreszierende Material der sich bildenden Zellplatte, in der überwiegend pektinöse Substanzen zu erwarten wären, von Cellulase angegriffen, während Pektinase auch hier keinen Effekt zeigte.

Wurden Protoplastenkulturen unter Benutzung einer Epifluoreszenz- Vorrichtung mittels eines Objektives mit hoher numerischer Apertur (über 0.9) betrachtet, so wurden neben den obigen Strukturen noch fibrilläre Strukturen gefunden (Abb. 2.A-D). Diese waren nur sichtbar, wenn auf die Vorder- oder Rückseite des Protoplasten fokussiert wurde. Der Durchmesser dieser Fibrillen betrug ca. 0.4um, was einer Anzahl von 5 Zellulose- Mikrofibrillen (ca. 40nm/Fibrille, Willison und Grout, 1978) entspräche, wenn man einen Überstrahlungsfaktor von 2 ansetzt (der jedoch wahrscheinlich weit zu niedrig gegriffen ist).

Abbildung 2

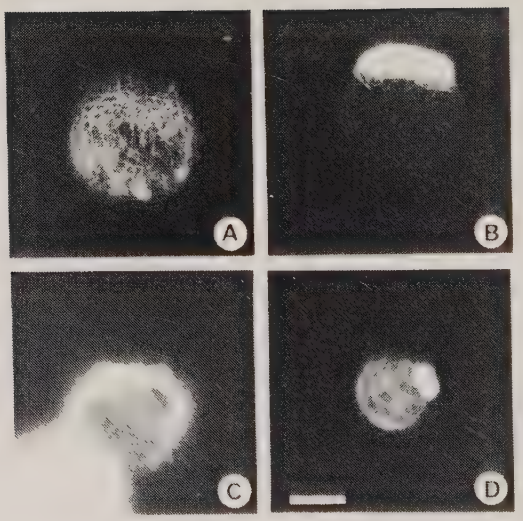
Zellwandbildung in Gegenwart von 10ug/ml CW. Ein Objektiv mit höherer numerischer Apertur (0.9) erlaubt die Auflösung von fibrillären Strukturen, die in der Größenordnung einzelner Mikrofibrillen liegen. (Balken: 25um)

(A) Gleichmäßige Ablagerung der Fibrillen in zufälliger Verteilung auf der ganzen Oberfläche.

(B) Ausgeprägtes "Capping". Von der Kappe reichen einige Fibrillen auf den Rest des Protoplasten. Die Kappe besteht selber auch aus einem fibrillären Gewebe, das jedoch im Bild aus phototechnischen Gründen nicht aufgelöst wird.

(C) Obwohl die Fibrillen normalerweise auf der Membran aufliegen, können sie in einigen Fällen auch abstehen.

(D) Bei Fibrillen und den voluminöseren Strukturen handelt es sich um unterschiedliche Strukturen, nicht nur um verschiedene Erscheinungsweisen des gleichen Phänomens unter verschiedenen Beobachtungsbedingungen.


A
B
C
D

Diese Fibrillen erschienen meist relativ gleichzeitig mit den anderen Strukturen auf denselben Zellen (Abb. 2.D), in einigen Fällen wurde auch nur die eine oder die andere Sorte beobachtet. Die Fibrillen erschienen gleichmäßig über die Zelloberfläche verteilt und nahmen mit der Zeit an Länge zu, nur in einigen Fällen wurde ein "capping" beobachtet, d.h., ein Pol der Zelle war mit Fibrillen bedeckt, während der andere noch unbedeckt war (Abb. 2.B). Solche Fibrillen konnten auch geringfügig von der Zelloberfläche abstehen (Abb. 2.C). Die Fibrillen konnten ebenfalls durch 0.1% Cellulase entfernt bzw. ihr Auftreten verhindert werden. Unabhängig davon, ob eine ab initio gefärbte Kultur oder eine direkt vor der Betrachtung angefärbte Kultur untersucht wurde, wiesen die Fibrillen im Gegensatz zu den voluminöseren Strukturen immer Difluoreszenz und damit kristallinen Charakter auf. Es handelt sich bei den fibrillären bzw. voluminösen Strukturen um unterschiedliche Strukturen, und nicht etwa um verschiedene Erscheinungsweisen, die durch unterschiedliche Beobachtungsmethoden hervorgerufen werden. Dies wird durch ihre gleichzeitige Beobachtbarkeit belegt (Abb. 2.D).

Da sich Protoplasten in ab initio gefärbten Kulturen normal entwickeln, sollte es möglich sein, die Entwicklung der Zellwand bei einem einzigen Protoplasten zu verfolgen. Die für die fluoreszenzmikroskopische Betrachtung notwendige Lichtintensität ruft jedoch bei jeder Beobachtung, und noch viel mehr bei jeder photographischen Aufnahme, eine Schädigung der Zelle hervor, so daß die Beobachtung der Entwicklung einer Einzelzelle über einen längeren Zeitraum bisher noch nicht erfolgreich gewesen ist. Bei Verwendung einer entsprechenden Kulturkammer (s. E.3.1.) oder einem umgekehrten Fluoreszenzmikroskop mit normaler Petrischale wären die Voraussetzungen gegeben, nur wäre eine empfindlichere Beobachtungsmethode nötig. Möglicherweise würde der Einsatz einer hochempfindlichen Videokamera in Kombination mit einer elektronischen Bildverarbeitungsanlage zum Erfolg führen.

E.2.4. Laser Mikrochirurgie an Calcofluor White- positiven Strukturen

Der Laser- Mikrostrahl (355nm) bot sich zur Manipulation von CW- positiven Strukturen an, insbesondere zur Abtrennung von den von der Membran abstehenden Strukturen (Abb. 3.A,B). Hierbei konnten zwei Fälle unterschieden werden: a) die Struktur wurde durch den Puls mechanisch zerstört und zersplitterte; b) die Struktur wurde nicht offensichtlich zerbrochen, sondern es entstand eher der Eindruck, daß nur das Fluorophor zerstört wurde. Die beiden Fälle scheinen Ausdrucksformen des schon mit der Difluoreszenz untersuchten Sachverhaltes zu sein, daß das fluoreszierende Material in kristalliner und amorpher Form vorliegen kann. Im kristallinen Zustand werden sich Einflüsse wie z.B. lokale Überhitzung und Druckänderung in der Art kleiner Explosionen durch Absplittern äußern, während in amorphen Strukturen solche Einflüsse weitgehend ohne zerstörenden Effekt auf die Struktur bleiben sollten.

Plaziert man einen Laserpuls zu nahe an die Membran und trifft sie, wird diese zerstört (s. E.3.3.). Daher ist es, bedingt durch den Durchmesser des "Hot Spot" von ca. 3um, in beiden Fällen nicht möglich, das fluoreszierende Material restlos zu entfernen.

E.2.5. Genetische Analyse von regenerierten Pflanzen aus ab initio Calcofluor White- gefärbten Protoplastenkulturen

Genetische Schädigungen, die an Einzelzellen hervorgerufen wurden, sollten sich besonders häufig in der Meiose finden lassen. Daher stellt die Fähigkeit zur Produktion keimfähiger Samen, neben der morphologischen Untersuchung der Gesamtpflanze, einen sehr empfindlichen Indikator für aberrante Entwicklungen dar. Aus diesem Grund wurden zwei regenerierte Pflanzen aus ab initio CW-

Tabelle 2

Pflanze	Generation	Phänotyp	Samenansatz	Keimrate
Nr. 1	P	normal	normal (spontan)	ca. 80%
Nr. 2	P	kleinwüchsig (Blüte normal)	gering (manuelle Bestäubung erforderlich)	ca. 22%
Kontrolle (Sämling)	P	normal	normal (spontan)	ca. 80%
Nr. 1	S_1	normal	normal (spontan)	ca. 80%
Nr. 2	S_1	normal	normal (spontan)	ca. 80%
Kontrolle	S_1	normal	normal (spontan)	ca. 80%
Nr. 1	S_2	normal	normal (spontan)	-
Nr. 2	S_2	normal	normal (spontan)	-
Kontrolle	S_2	normal	normal (spontan)	-

Tabelle 2. Genetische Analyse der Regenerate von Mesophyll- Protoplasten von *N. tabacum* aus *ab initio* Calcofluor White Cokulturen

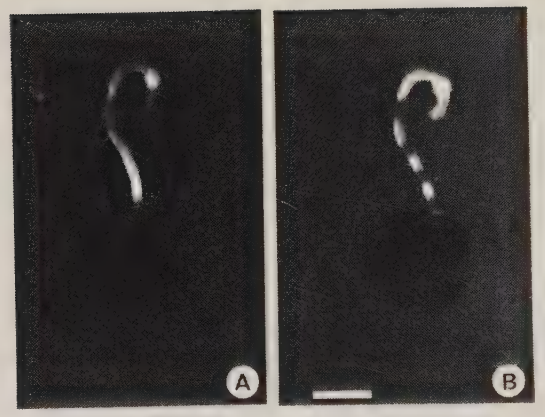


Abbildung 3

(A) Zellwandmaterial wird in das Medium ausgeschieden.

(B) Laser- Microchirurgie erzeugte Läsionen an vier Stellen. Das ausgeschiedene Material scheint nicht kristallin zu sein (s. Text). (Balken: 25um)

gefärbten Mesophyllprotoplastenkulturen von N. tabacum sowie deren zwei Selbstungs- Tochtergenerationen untersucht. Die Ergebnisse sind in Tab. 2 zusammengefaßt. Eine der beiden regenerierten Pflanzen (No.1) sah phänotypisch normal aus und zeigte auch normalen Samenansatz und Keimfähigkeit, während die andere (No.2) durch kleineren Wuchs auffiel und manuell bestäubt werden mußte, da sie spontan keinen Samen ansetzte. Die Blütenmorphologie war jedoch normal. Diese Pflanze erzeugte insgesamt nur wenige Samen mit verminderter Keimfähigkeit. In der Selbstungsnachkommenschaft waren dagegen beide Pflanzen unauffällig.

E.3. Plasmastränge, Plasmaströmung und Protoplastenform

E.3.1. Entwicklung einer Kulturkammer für Laser-Mikrochirurgie

Eine Kulturkammer für Laser- mikrochirurgische Experimente sollte folgenden Erfordernissen genügen:

(i) Ein genügend hoher Prozentsatz der Zellen sollte sich normal entwickeln.

(ii) Die Kammer sollte sterilisierbar und nach Möglichkeit wiederverwendbar sein.

(iii) Die Zellen sollten sich in der Kammer nicht durch Konvektion oder andere Phänomene bewegen.

(iv) Die optischen Qualitäten müssen den physikalischen Gegebenheiten entsprechen, d.h. mindestens eine Fläche muß durchlässig für ultraviolettes Licht und für die mikroskopische Beobachtung geeignet sein sein.

Für tierische Zellkulturen werden üblicherweise die sog. Rose- Chambers verwendet (s. z.B. Liaw und Berns, 1981). Da diese Kammern aber ein relativ großes Volumen von etwa 2ml besitzen, erwies sich ihre Benutzung in zweierlei Hinsicht als nachteilig. Im Gegensatz zu kultivierten Tierzellen heften sich die

Protoplasten nicht am Subtrat an und unterlagen so den bei diesen Volumina unvermeidlichen Konvektionsströmungen. Zum anderen war die O_2- permeable Oberfläche im Verhältnis zum Volumen zu klein, so daß die Zellen nur einige Stunden mit nachlassender Qualität überlebten. Der bei tierischer Zellkultur übliche Medienwechsel ließ sich bei Protoplastenkulturen aus dem bereits erwähnten Grund - Nichtanheftung der Zellen - nicht durchführen, da sie mit dem Medium ausgespült würden.

Von den Rose- Chambers wurde jedoch das Prinzip übernommen, die Zellen zwischen einem normalen (in diesem Falle Quarz-) Deckglas und einem relativ O_2- permeablen Polystyrol- Deckglas (mit schlechten optischen Eigenschaften) zu kultivieren. Die Volumenreduktion auf 10 bis 40ul wurde durch die Verkleinerung des Durchmessers und des Abstandes zwischen den beiden Deckgläsern erreicht. Als Dichtungsmaterial wurde Silikonfett als optimal gefunden, das ebenfalls eine gewisse O_2- Permeabilität besitzt. Paraffinöl besitzt bezüglich der Dicht- und Permeationseigenschaften ebenso gute Eigenschaften, erwies sich jedoch als in der Handhabung schwierig. In den so konstruierten Kammern konnten sich bei einem Volumen bis zu 10ul die eingeschlossenen Zellen bis mindestens zum 2- Zellstadium im gleichen Maße wie die Kontrollkulturen in Petrischalen entwickeln. Bei größeren Volumina (bis zu 40ul) war ein Gradient der Teilungshäufigkeit von außen nach innen zu verzeichnen. Dieser Effekt konnte bis zu einem gewissen Grade durch den Einschluß von Luftblasen behoben werden.

E.3.2. Zeitraffer- Beobachtung an Protoplasten

Intakte Protoplasten zeigen meist eine heftige Plasmaströmung, wie sie auch in anderen pflanzlichen Systemen sowie in gewissen Algen, Pilzen und Protisten anzutreffen ist (Allen und Allen, 1978a,b; Palevitz, 1976). In vielen Pflanzenzellen und insbesondere in Callus- Protoplasten ist das

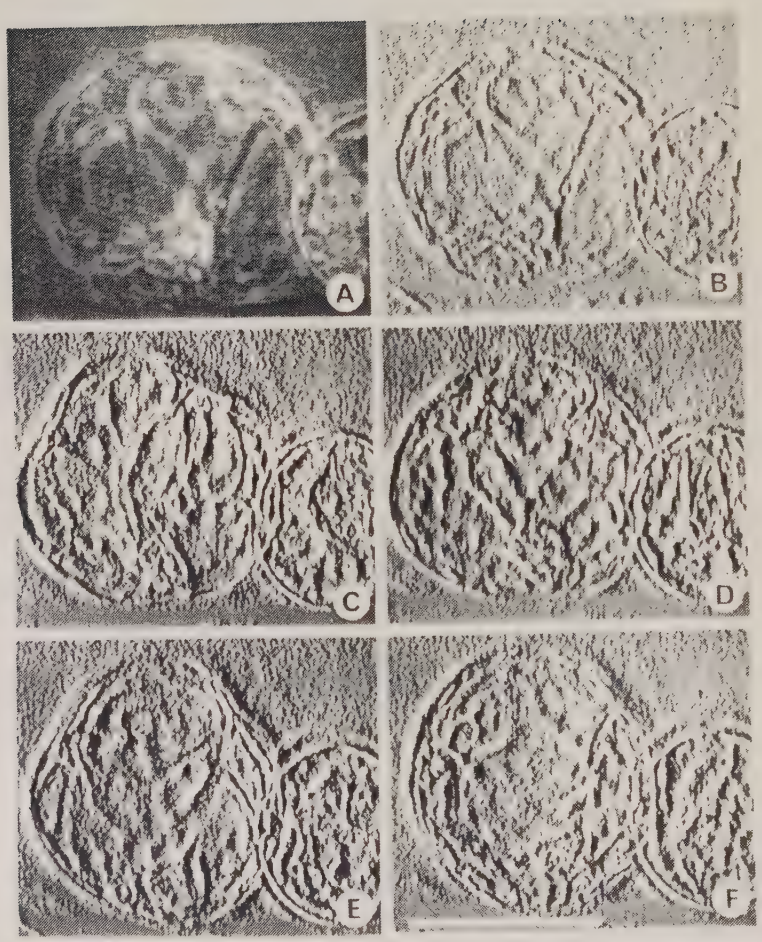
Abbildung 4

Formveränderung eines frisch isolierten Hibiskus Callus-Protoplasten. Die Bildserie repräsentiert Momentaufnahmen aus einem Zeitraffer- Videoband, das eine Zelle über mehrere Stunden verfolgt, ohne daß die Schärfeebene verändert worden wäre. Die Aufnahmen wurden vom Bildschirm einer elektronischen Bildverarbeitungsanlage gemacht. (Balken: 50um)

(A) Die Zelle wurde mit Phasenkontrast- Optik aufgenommen, und das daraus resultierende Videobild elektronisch kontrastverstärkt. Der Protoplast hat eine leicht ovale Form und einen relativ gleichmäßigen Umriß.

(B) Wie (A), nur daß das Bild im Differential-Phasenkontrast- Verfahren dargestellt ist, welches ein elektronisches Äquivalent zum Differential- Interferenzkontrast-Verfahren ist (Berns et al., 1981). Dunkle Stellen des Originals erscheinen als Vertiefungen, helle Stellen als Erhebung. Der körnige Hintergrund wird durch die Rasterung des Bildschirms verursacht.

(C) - (F) Aufnahmen desselben Protoplasten in zeitlicher Abfolge. Die Zeitabstände zwischen den einzelnen Bildern sind unregelmäßig, aber in der Größenordnung von 10-20 min. Die Formveränderungen sind offensichtlich, ebenso die unterschiedliche Anordnung der Plasmastränge. Auch zum Zeitpunkt der letzten Aufnahme war der Protoplast noch frei von Zellwand, wie mit Calcofluor White Färbung nachgewiesen wurde.


A
B
C
D
E
F

Cytoplasma in strangähnlichen Strukturen organisiert, die die Vakuole(n) durchziehen. Die folgenden Untersuchungen wurden an Protoplasten von Hibiskus und N. glutinosa durchgeführt. In den Strängen dieser Protoplasten ist die cytoplasmatische Strömung sehr gut sichtbar. Innerhalb eines Stranges können sich Partikel in beiden Richtungen bewegen. Die beobachtete Strömungsgeschwindigkeit lag bei 3-5um/min. Die Stränge selber waren keine fixen Strukturen, sondern änderten ständig ihre Anfangs- bzw. Endpunkte oder zogen sich vollständig zurück oder bildeten sich neu. Dies ist ein sehr dynamischer Vorgang (Abb. 4.A-F). Zusammen mit der Verlagerung der Plasmastränge ging eine Veränderung der äußeren Form einher: am Schnittpunkt zwischen Strang und Plasmamembran erschien eine Einziehung, am besten als "Delle" beschrieben (Abb. 5). Die Anwesenheit solcher Dellen ist nicht der Normalfall in Callusprotoplasten, tritt aber recht häufig auf. Möglicherweise entspricht ihr Auftreten einer Reaktion der Zelle auf die Isolierung des Protoplasten. Verlagerte sich der entsprechende Strang, so veränderte auch die Delle ihre Lage und Charakteristik (wie z.B. die Tiefe der Einbuchtung) (Abb. 5).

Diese dynamischen Veränderungen ließen sich sehr gut mit Hilfe von Zeitraffer- Aufnahmen beobachten. Sie bildeten die Grundlage für die Entscheidung, den Zusammenhang zwischen Strömung, Strängen und Zellform näher zu untersuchen, insbesondere, da nicht vollständig kugelige Einzelzellen allgemein immer als Produkte unvollständiger Protoplasten- Isolierung angesehen wurden, die Einschnürungen also mit Zellwandresten begründet werden, die u. U. unter der Erfassungsgrenze von CW liegen (F. Hoffmann, O.L. Gamborg, mdl. Mitt.).

E.3.3. Mikrochirurgie an Plasmasträngen

Mit Hilfe des Laser- Mikrostrahls ist es möglich, an genau definierter Stelle eine Läsion innerhalb der Zelle zu verursachen.

In diesen Untersuchungen wurde Licht von 266nm Wellenlänge verwendet, weil diese Wellenlänge in der Nähe des Absorptionsmaximums von Proteinen liegt. Da der Lichtstrahl in Form eines Konus aus dem Objektiv austritt und erst im Brennpunkt seine volle Energiedichte erreicht, werden die Membran und über oder unter dem Zielpunkt liegende Cytoplasmaschichten mit den darin enthaltenen Organellen nicht merklich geschädigt.

Es war wesentlich, daß die eingestrahlte Energie sorgfältig eingestellt wurde. Bei zu geringer Energie (in diesen Experimenten unter 1uJ/Puls) wurde kein Effekt beobachtet, bei zu hoher Energie (über 20uJ/Puls) platzten die Protoplasten in der Regel, vermutlich wegen der zu hohen Wärmeentwicklung. Die optimale Energie wurde als etwa 11uJ/Puls ermittelt.

Bei dieser Energie- Einstrahlung wurde die Integrität des Protoplasten nur dann zerstört, wenn der Puls direkt auf die Plasmamembran fokussiert war. Wurde der Vakuolen- Innenraum anvisiert, war keine Reaktion sichtbar, ebensowenig bei einem Schuß direkt außen neben die Zelle.

Wurde jedoch ein Strang beschossen, riß dieser in der Regel, und beide Enden zogen sich innerhalb von einigen Sekunden zurück und verschwanden im verankernden Cytoplasma. Über diesen lokalen Effekt hinaus konnte ein solcher Schuß einen Einfluß auf die gesamte Zelle ausüben, wenn ein Hauptstrang getroffen wurde. Es verschwanden dann sämtliche Stränge, und die Strömung kam in der ganzen Zelle zum Erliegen. In solchen Fällen scheint das Plasma gleichmäßig im cortikalen Bereich der Zelle verteilt zu sein, und die Vakuole nimmt einzeln und unzerteilt den Innenraum ein. Gleichzeitig mit dem Verschwinden der Stränge wurde ein Verlust der Unregelmäßigkeiten in der Zellform beobachtet, der Protoplast wurde völlig rund (Abb.5). Unmittelbar nach dem Erliegen der Strömung vibrierten die cytoplasmatischen Partikel in zufälligen Richtungen, an Brown'sche Molekularbewegung erinnernd. Nach einigen (ca. 3) Minuten änderte sich die Vibration zu saltatorischen Bewegungen, die langsam in eine geordnete Strömung

Abbildung 5

Laser- Microchirurgie an einem Cytoplasmastrang in einem isolierten Protoplasten (Hibiskus Callus). Eine solche Zelle hat eine heftige Plasmaströmung und keinerlei Zellwandreste. (Balken: 25um)

(A) Vor dem Schuß: Unregelmäßig geformter Callus- Protoplast mit ausgeprägten Plasmasträngen. Einkerbungen sind immer mit Plasmasträngen korreliert. Der Pfeil kennzeichnet die Stelle, an der die Bestrahlung stattfinden wird.

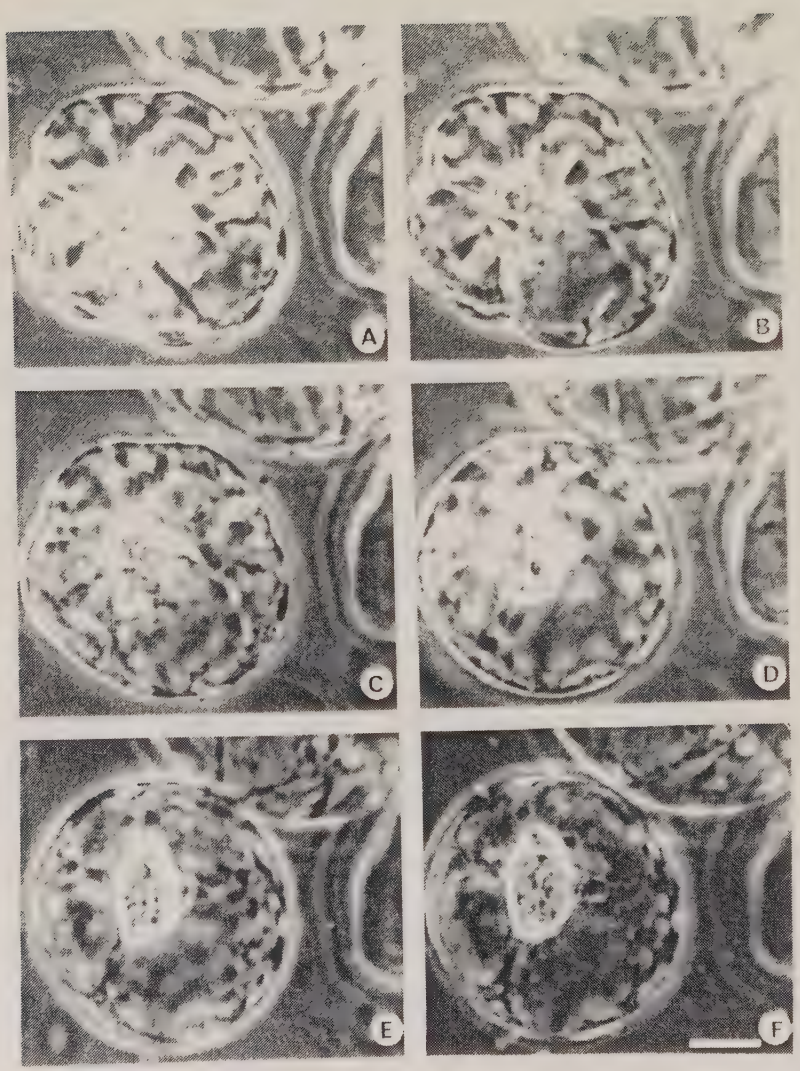
(B) 30 sec nach dem Schuß: Ein Rest des beschossenen Stranges ist noch sichtbar (Pfeil). Erste Formänderungen treten auf.

(C) 7 Min. nach dem Schuß: Die Cytoplasmastränge lösen sich auf. Der Protoplast nähert sich der Kugelform.

(D) 10 Min. nach dem Schuß: Die Zelle ist rund, alle Plasmastränge sind aufgelöst.

(E) 13 Min. nach dem Schuß: Plasmastränge werden wieder sichtbar.

(F) 15 Min. nach dem Schuß: Die Plasmastränge treten stärker hervor. Der Protoplast ist bereits leicht oval. Der Erholungsprozess schreitet bis zur vollständigen Erholung fort.


A
B
C
D
E
F

übergingen. Nach 10-30 Minuten war die ursprüngliche Strömungsgeschwindigkeit wieder erreicht. Außerdem war die Organisation des Cytoplasmas in Stränge wiederhergestellt. Die Zelle war wieder normal, sogar die vorher beobachteten Einschnürungen tauchten wieder auf. Eine Korrelation der Lage der Stränge und Einschnürungen vor dem Schuß und nach der Erholung scheint nicht zu bestehen. Allem Anschein nach sind diese Parameter vom Zufall abhängig. Es scheint, als ob die saltatorischen Bewegungen zunächst innerhalb der cortikalen Plasmaschicht sich zu Bahnen ordnen und erst später aus diesem Plasmapool Stränge ins Zellinnere entsandt werden. Dieselbe Zelle konnte wiederholt (mindestens 3 mal) beschossen werden, und nach jedem Schuß konnte dieselbe Abfolge von Reaktionen beobachtet werden, ohne daß eine Ermüdung der Regenerationsgeschwindigkeit erfolgte.

Falls der beschossene Strang nur von untergeordneter Bedeutung war, wurden zwar ähnliche Effekte beobachtet, jedoch nur von lokaler Ausdehnung, in Abhängigkeit von der Größe des Stranges. Die losen Enden wichen ebenfalls zurück, benachbarte Stränge konnten verschwinden und es kam zu lokalen Formveränderungen. Der Rest der Zelle erschien unbeeinflußt. Es entstand einfach ein größerer, ununterteilter Vakuolenraum an der beschossenen Stelle. Die Plasmaströmung kam nur in der näheren Umgebung des beschossenen Stranges zum Erliegen. Entprechend ging auch die Erholung der Zelle schneller vonstatten. Neue Stränge wurden beinahe sofort wieder eingezogen. Insgesamt war eine größere Aktivität der Strangumlagerungen zu beobachten. Die komplette Erholung der Zelle, d.h. Rückkehr zu normaler Aktivität und Strangverteilung, dauerte ebenfalls 10-30 Minuten. Auch in diesem Falle war die Verteilung der neuen Stränge zufällig und nicht mit der alten korrelierbar.

Die erfolgreiche Erholung einer beschossenen Zelle wurde an 10 Zellen beobachtet, insgesamt wurden etwa 100 Zellen beschossen. Die Zellen, die sich nicht erholten, hatten infolge

experimenteller Unzulänglichkeiten irreversible Verletzungen erlitten (s.u.).

Die beschriebenen Effekte wurden nur in strömenden Zellen beobachtet. In nichtströmenden Zellen trat kein Reißen des Stranges auf, das Cytoplasma schien in einem fixierten Zustand vorzuliegen.

Wurde durch den Schuß versehentlich eine Vakuole beschädigt, so brachen Stränge und Strömung irreversibel zusammen. In diesen Fällen schien das Cytoplasma, vermutlich unter dem Einfluß der sauren Vakuolen- Inhaltsstoffe, zu koagulieren. Nicht einmal Brown'sche Molekularbewegung war noch zu beobachten. Unter diesen Umständen wurde niemals eine Erholung der Zelle beobachtet.

Da alle hier beschriebenen Beobachtungen an Hibiskusprotoplasten (die unter den gegebenen Bedingungen keine nennenswerte Zellwand regenerierten, s. E.3.5.) und N. glutinosa-Protoplasten (die sich völlig normal verhalten und mit der Zellwandsynthese während der Versuchsdauer begannen) mit gleichen Ergebnissen gemacht wurden, sind sie nicht auf nur einen (eventuell abnormalen) Zelltyp beschränkt.

E.3.4. Hemmstoffbehandlung von Protoplasten

Um die Komponenten des Cytoskeletts identifizieren zu können, die an der Organisation in Stränge, an der Strömung und der Erzeugung der inneren Spannung beteiligt sind, wurden Hemmstoffversuche an den Protoplasten unternommen. Die für den Zusammenhalt der Stränge hauptsächlich in Frage kommenden Strukturen sind, neben dem mikrotrabäkulären Netzwerk, Mikrotubuli und Mikrofilamente. Insbesondere Mikrofilamente sind an der Plasmaströmung ursächlich beteiligt (s.z.B. Bradley, 1973; Shimmen und Tazawa, 1982). Dementsprechend wurde der Einfluß von Colchicin (fördert den Abbau von Mikrotubuli) (Gunning und Hardham, 1982), Taxol (fördert den Aufbau von Mikrotubuli) (Gunning und Hardham,

1982), Cytochalasin B (fördert den Abbau von Mikrofilamenten) (Allen und Allen, 1978a) und Phalloidin (fördert den Aufbau von Mikrofilamenten) (Palevitz, 1980) auf das Verhalten der Protoplasten gegenüber microchirurgischen Experimenten untersucht.

E.3.4.1. Mikrotubuli- Hemmstoffe

E.3.4.1.1. Colchicin

Die Minimalkonzentration an Colchicin für 100%ige Teilungshemmung wurde als 1mM bestimmt. Dieser Wert ist im Vergleich zu den bei tierischen Zellen wirksamen Konzentrationen (einige uM) recht hoch. Pflanzenzellen sind jedoch im typischen Fall um ein bis drei Größenordnungen weniger empfindlich für Colchicin (vgl. Gunning und Hardham, 1982), was sich in der erhöhten erforderlichen Konzentration für die vollständige Teilungshemmung ausdrückt.

Die Behandlung der Protoplasten mit 1mM Colchicin ließ keine Effekte erkennen, die im Zusammenhang mit den mikrochirurgischen Experimenten von Interesse gewesen wären: Strömung, Stränge und Form der Protoplasten waren unbeeinflußt. Lediglich nach längerer Kultur (länger als 24h) blieben die Colchicin- behandelten Zellen rund, während die Kontrollzellen elongierten.

E.3.4.1.2. Taxol

Die Minimalkonzentration an Taxol für 100%ige Teilungshemmung wurde als 100uM ermittelt. Die vorliegenden Literaturdaten beziehen sich auf die Empfindlichkeit von Mikrotubuli in vitro; die dort verwendeten Konzentrationen liegen in der Größenordnung von 20uM (Kumar, 1981; Morejohn und Fosket, 1982).

Ein Einfluß der Taxolbehandlung auf das Verhalten der Zellen bei der Laserbehandlung war wie bei der Colchicinbehandlung nicht zu erkennnen. Wären Mikrotubuli maßgeblich an der Aufrechterhaltung z.B. der Spannung beteiligt, so wäre durch

Taxolbehandlung ein stabilisierender Effekt zu erwarten.

E.3.4.2. Mikrofilament- Hemmstoffe

E.3.4.2.1. Phalloidin

Für 100%ige Teilungshemmung wurde eine Minimalkonzentration von 1mM Phalloidin gefunden. Über den Einfluß von Phalloidin auf die Zellteilung sind in der Literatur keine direkten Vergleichswerte vorhanden. Bei Allium Epidermiszellen wurden bei 100-200uM Phalloidin Fehlentwicklungen bei der Zellteilung festgestellt (Palevitz, 1980), eine vollständige Teilungshemmung jedoch nicht berichtet.

Phalloidin hatte keinen Einfluß auf die Plasmaströmung. Diese Beobachtung unterscheidet sich von den an Allium Epidermiszellen gemachten Beobachtungen, wo Phalloidin die Strömung vollständig zum Stillstand bringt (Palevitz, 1980). Bezüglich der mikrochirurgischen Experimente wurde weder eine Stabilisierung noch eine Destabilisierung der zellulären Strukturen gefunden.

E.3.4.2.2. Cytochalasin B

Eine Minimalkonzentration von Cytochalasin B für die spezifische Hemmung der Zellteilung konnte nicht bestimmt werden, da bei 10ug/ml die meisten, bei 50ug/ml alle Zellen bereits nach ca. 12h nicht mehr lebten, während 1 und 5ug/ml keinen Effekt zeigten. In Nitella und Chara, den Standardobjekten für die Cytoplasma- Strömungsforschung, stoppt Cytochalasin B die Strömung vollständig und reversibel bei 1-50ug/ml (Bradley, 1973; Nagai und Kamiya, 1977). Eine vollständige und reversible Hemmung der Strömung wurde in der vorliegenden Arbeit bei den verwendeten Protoplasten in statistisch signifikanter Zahl bei Minimalkonzentrationen von 10ug/ml beobachtet.

Bei einer Konzentration von 10 ug/ml bewirkt Cytochalasin B innerhalb von 10-15min eine Reaktion, die der Laser- Behandlung

sehr ähnelt: die Organisation des Plasmas in Stränge wird aufgelöst, und die Strömung kommt vollständig zum Erliegen. Zellen mit unregelmäßiger Form runden sich ab (Abb. 6). Es handelt sich mit aller Wahrscheinlichkeit nicht um eine unspezifische Schädigung der Zellen, da Auswaschen des Hemmstoffes eine Erholung der Zellen bewirkt: die Strömung setzt wieder ein, Stränge werden gebildet, und sogar die Deformation kehrt bei vielen Zellen wieder. Bei längerer Kultur unter normalen Bedingungen sind diese erholten Zellen teilungsfähig. Der Unterschied in der Zahl der Zellen mit diffusem Cytoplasma nach und vor der Cytochalasinbehandlung (a), bzw. nach und vor dem Auswaschen (b) ist statistisch hoch signifikant (beurteilt mittels t- Test). Die Werte sind t_{120a}=14.01, t_{120b}=4.25. Bei 120 ausgezählten Zellen beträgt der Wert für eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 0.5% $P_{0.005}$=3.37.

Da die Protoplasten sich normalerweise nicht am Untergrund anheften und wegen des möglichen Einflusses auf das Cytoskelett keine Anheftung mit Polylysin vorgenommen wurde, konnte die Schädigung und spätere Erholung der Zellen nach dem Auswaschen nicht an individuellen Protoplasten verfolgt werden. Entsprechende Beobachtungen sind jedoch an Nitella (Rebhun, 1972) und Chara (Nagai und Kamiya, 1977) gemacht worden. Die Beschreibungen der Erholungsvorgänge nach vorangegangener Cytochalasin B- Behandlung in diesen beiden Algen erinnern sehr stark an die Beobachtungen, die bei der Erholung der Zellen nach Laser- Microchirurgie gemacht wurden. So werden auch in diesen Algen Übergänge von Bewegungen ähnlich der Brown'schen Molekularbewegung über saltatorische Bewegungen hin zu normalem Strömen in definierten Bahnen berichtet. Es besteht kein Grund anzunehmen, daß die Erholung von der Cytochalasin B- Vergiftung in Protoplasten höherer Pflanzen nicht ähnlich verläuft. Die beobachteten ausgeprägten Effekte von Cytochalasin B deuten auf eine prominente Rolle von Mikrofilamenten bei der Strömung und der Organisation in Stränge hin.

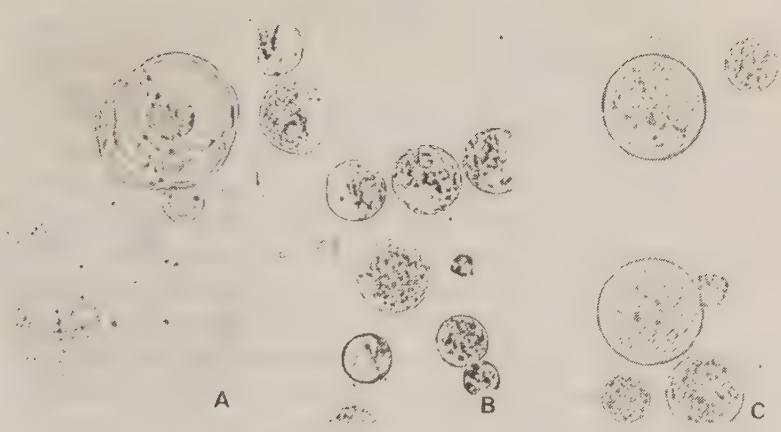


Abbildung 6

Cytochalasin B- Behandlung von isolierten Protoplasten. (Balken: 50um)

(A) Unregelmäßig geformte Callus- Protoplasten mit ausgeprägten Plasmasträngen.

(B) Typisches Erscheinungsbild nach Cytochalasin B- Behandlung. Die Zellen sind rund und weisen keine Stränge auf. (10 Min. nach Zugabe von 10ug/ml Cytochalasin B)

(C) Typisches Erscheinungsbild nach Entfernung des Hemmstoffes. Neue Stränge werden ausgebildet. Verschiedene Erholungsgrade sind erkennbar. (10 Min. nach Auswaschen)

E.3.5. Elektronenmikroskopische Untersuchung der Callusprotoplasten

Es war immer eine gängige Annahme, daß ein isolierter Protoplast, d.h., eine Zelle, die völlig frei von Zellwandmaterial ist, eine perfekte Kugelform aufweist. Die Laser- Experimente brachten Zweifel an dieser Annahme auf und schlossen die Formgebung durch Zellwandreste aus, nicht aber deren Anwesenheit. Da CW nicht mit Sicherheit minimale Mengen von Zellwandmaterial anzeigt, mußten Zellwandreste mittels Elektronenmikroskopie ausgeschlossen werden. Abb. 7 zeigt, daß auch bei hoher Vergrößerung (40000x) kein fibrilläres Material außerhalb der Zelle erkennbar ist. Allenfalls sind exocytotische Prozesse zu beobachten.

Aus der Abwesenheit von Zellwandmaterial folgt, daß die Form der Zelle endogen bestimmt sein muß. Aus diesem Grunde sind die Stellen der Einbuchtungen, an denen auch die Cytoplasma- Stränge vom cortikalen Plasma entspringen, von besonderem Interesse und wurden eingehend (sämtliche in Frage kommenden Serienschnitte) untersucht.

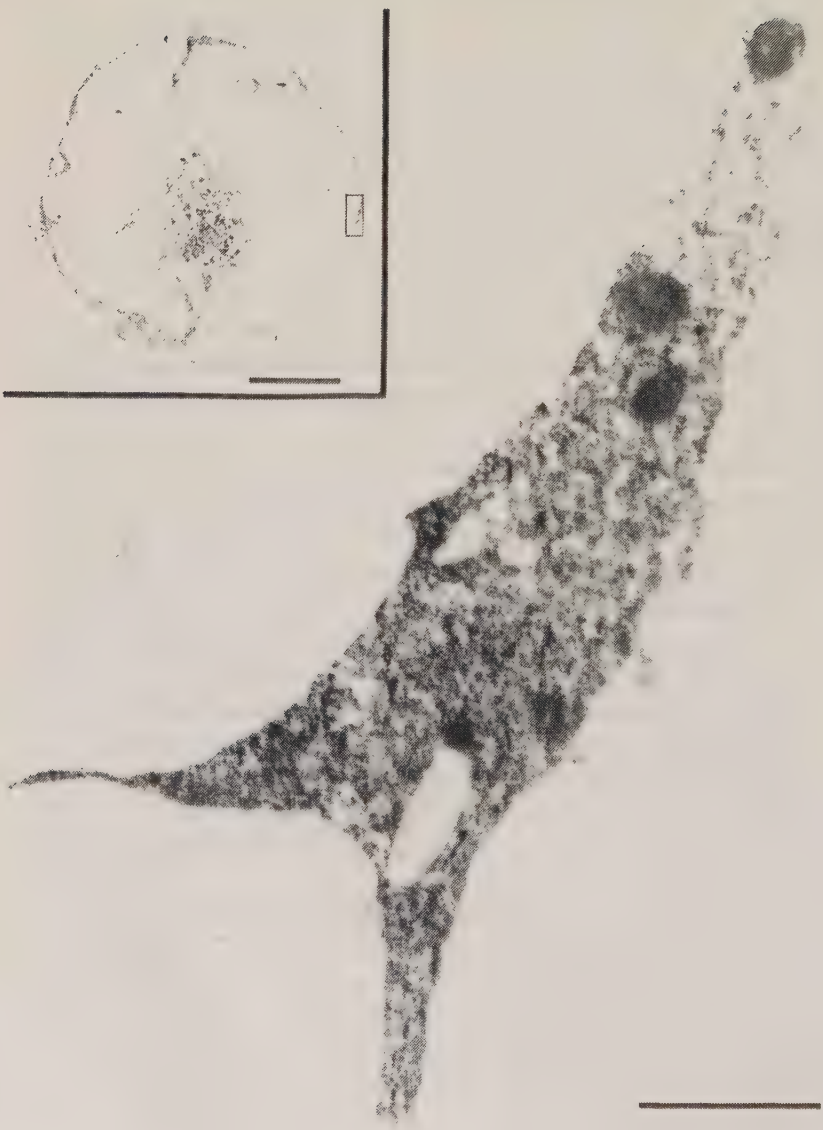
Diese kritischen Stellen weisen ultrastrukturell keinerlei Besonderheiten auf, insbesondere sind cytoskelettale Elemente nicht erkennbar (Abb. 7). Allerdings ist hierzu anzumerken, daß in pflanzlichen Zellen die Präparation von Mikrofilamenten für die Elektronenmikroskopie ohne einschlägige Erfahrung und besondere Fixierungsmethoden sehr problematisch ist (Hepler und Palevitz, 1974).

Das einzige wiederkehrende Merkmal dieser Verbindungsstellen zwischen cortikalem und Strang- Cytoplasma ist die Verdickung dieser Verbindung gegenüber dem umliegenden Plasma (Abb. 7).

Nach den elektronenmikroskopischen Bildern ist es nicht offensichtlich, wie die Spannung des Cytoplasmas, die nach den Laser- mikrochirurgischen Beobachtungen gefolgert werden muß, zur

Abbildung 7

Cortikale Plasmaregion eines Hibiskus Callus- Protoplasten. Die hier gezeigte elektronenmikroskopische Aufnahme repräsentiert das Ergebnis von 5 aufeinanderfolgenden Serienschnitten dieser Region, die den gesamten Mündungsbereich des Plasmastranges in das cortikale Cytoplasma erfassen. Es ist keinerlei aufgelagertes Zellwandmaterial sichtbar, das für die Einschnürung verantwortlich sein könnte. Das Cytoplasma enthält keine sichtbaren Strukturelemente, wie etwa Mikrotubuli oder Mikrofilamente. Der Mündungsbereich des Stranges ist gegenüber den umliegenden Plasmabereichen verdickt. (Vergrößerung 40000fach, Balken: 1um). Der Einsatz zeigt die Gesamtansicht des Protoplasten in demselben Schnitt. Der Kasten gibt die Lage der Ausschnittsvergrößerung an. Die Einschnürungen sind mit den Mündungsbereichen der Plasmastränge korreliert. (Balken: 20um)



Verformung der Zelle übertragen wird. Die Übertragung der Kräfte könnte durch den generellen Zusammenhalt des Cytoplasmas geschehen, oder durch z.B. Mikrofilamente, die bei der Aufarbeitung verloren wurden.

E.4. Protoplastenfusion mittels Laser

Da sich mit dem Laser- Mikrostrahl sehr kleine Läsionen innerhalb biologischer Strukturen einführen lassen, entstand die Idee, mittels eines Laser- Schusses die Fusion zweier Protoplasten zu induzieren, indem an zwei eng aneinanderliegenden Membranen Läsionen induziert werden, und diese dann über Selbstheilungsprozesse die Fusion einleiten. Hierzu war es notwendig, zwei Protoplasten in genügend engen Kontakt zu bringen. Die niedrigst mögliche Konzentration an Polyäthylenglykol (5%), die dies bewirkte, lag weit unter den Konzentrationen, die üblicherweise in Fusionsexperimenten verwendet werden (ca. 13%). Zusätzlich zu 5% Polyäthylenglykol enthielt das Medium noch 60mM $CaCl_2$ bei normalem pH (=5.8). Diese Konzentrationen erlaubten den Protoplastenkulturen noch normale Teilungsraten, was bei über 10% Polyäthylenglykol nicht mehr ohne Auswaschen zu erreichen war. Unter den beschriebenen Agglutinations- Bedingungen agglutinierten je nach Zelldichte der Kultur bis zu 20% aller Zellen und blieben einige Stunden lang agglutiniert. Danach lösten sich die Zellen wieder voneinander, was auch bei höherer PEG- Konzentration auftritt. Die Kultur ist dann mikroskopisch nicht von einer unbehandelten Kultur zu unterscheiden. Die im folgenden beschriebenen Versuche wurden an Callusprotoplasten von Hibiskus und N. glutinosa durchgeführt.

Um erfolgreich eine Fusion zu induzieren, mußte der Schuß exakt auf die Grenzfläche zwischen den beiden Protoplasten abgegeben werden. Insbesondere das Fokussieren erwies sich als schwierig, da sich infolge der Brechungsindizes der beteiligten

Materialien (Plasma, Membranen) die Grenzfläche kaum erkennen ließ und die richtige Schärfeebene eher "erfühlt" werden mußte. Die Verwendung von Mesophyllprotoplasten war nicht möglich, da die Grenzfläche nicht beschossen werden konnte, ohne einen Chloroplasten zu treffen. Vermutlich auf Grund der hiermit verbundene Hitzeentwicklung resultierte der Beschuß eines Chloroplasten unweigerlich in einer geplatzten Zelle.

In einigen Fällen (ca. 10 von 100 Versuchen) war jedoch die Fusion zweier Callusprotoplasten erfolgreich (Abb. 8). Der Verlauf der Fusion konnte in allen Phasen und in allen Einzelheiten mikroskopisch verfolgt werden. Die Verschmelzung der Membranen ging eindeutig vom Zielpunkt des Laser-Schusses aus und breitete sich von dort ringförmig über die Grenzfläche aus. Erreichte die "Fusionswelle" die äußere Einschnürung zwischen den beiden agglutinierten Zellen, begann die Abrundung und schritt mit etwa der gleichen Geschwindigkeit fort, mit der auch die Verschmelzung der Grenzflächen- Membranen verlaufen war. Derart fusionierte Protoplasten wurden nicht längerfristig auf ihre Teilungsfähigkeit hin beobachtet.

E.5. Dreidimensionale Rekonstruktion eines Callus-Protoplasten

Die Ergebnisse der Laser- Mikrochirurgie ließen immer wieder die Frage nach der Organisation der Cytoplasmastränge aufkommen, und damit nach der internen Struktur eines Callusprotoplasten. Die Literatur berichtet nur ziemlich ungenau von "transvakuolären Strängen" (z.B. Alberts et al., 1983; Küster, 1935; Palevitz, 1980). Andererseits wird die Struktur des Callus- Protoplasten häufig von der des Mesophyll- Protoplasten dadurch abgegrenzt, daß dieser eine große, zentrale Vakuole besäße, während jener durch viele, kleine, voneinander unabhängige Vakuolen gekennzeichnet sei. Um die Vorgänge bei der Zerstörung und Erholung der

Abbildung 8

Fusion zweier Protoplasten mittels eines Laserpulses (zur Aufnahmetechnik s. Abb. 4). (Balken: 30um)

(A) Die Protoplasten wurden mit einer niedrigen Konzentration von Polyäthylenglykol (5%) agglutiniert.

(B) Direkt nach dem Schuß auf die trennende Membran (Pfeil) verschmelzen die beiden Zellen miteinander, und die Hybridzelle wird oval.

(C) Die Verschmelzung schreitet fort, und die Cytoplasmamassen durchmischen sich langsam.

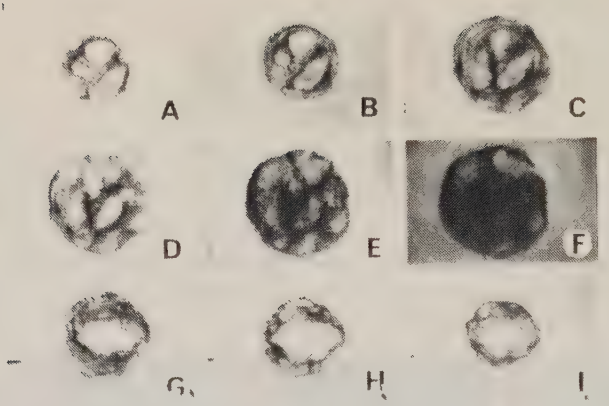


Abbildung 9

Rekonstruktion eines Callus- Protoplasten mittels Seriendünnschnitten. Die Dünnschnitte wurden photographiert, und die Photographien auf transparente Plastikfolien übertragen. Die Folien wurden übereinandergeschichtet, und so Informationen über die innere Struktur des Protoplasten gewonnen, die in der interpretierenden Zeichnung (Abb. 10) verarbeitet sind. Hier sind repräsentativ einige Stadien der Rekonstruktion dargestellt. (A)-(F) repäsentieren zunehmende Schichtdicken der einen, (G)- (I) abnehmende Schichtdicken der anderen Hälfte.

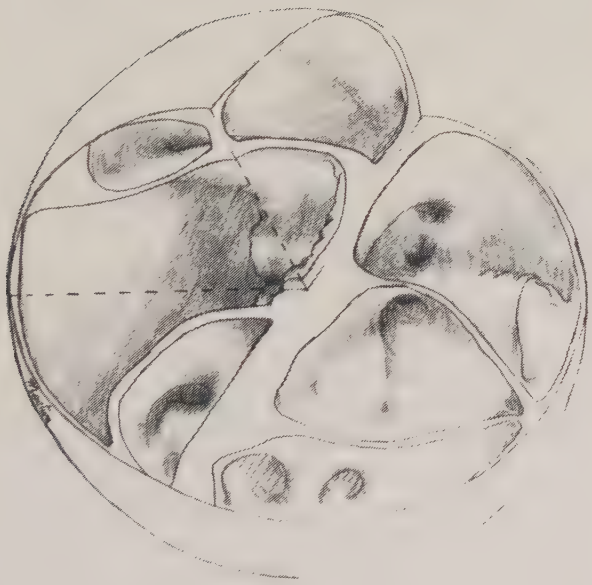
Cytoplasmastränge verstehen zu können, war es notwendig, zunächst die Form und Verteilung der Plasmastränge im Protoplasten zu untersuchen.

Hierzu wurde ein Protoplast nach Fixierung und Einbettung für die Elektronenmikroskopie in 0.5um dicke Serienschnitte geschnitten und diese nach Färbung photographiert. Bei dem untersuchten Protoplasten ergaben sich 75 Schnitte. Die geringe Dicke wurde gewählt, um eine gute räumliche Auflösung zu erreichen, allerdings mußte dafür ein sehr geringer Kontrast in Kauf genommen werden. Dies war umso störender, als Callus-Protoplasten, wie die meisten pflanzlichen Zellen, überwiegend aus "leeren" Vakuolenbereichen mit sehr dünnen Plasmaflächen bestehen. Die Photographien wurden auf transparente Plastikfolie von Hand übertragen und die Folien übereinandergeschichtet. Abb. 9 zeigt einige Beispiele der auf diese Weise gewonnenen rohen Bilder. Da sich die ursprünglich vorgesehene Computer- Rekonstruktion als technisch zu aufwendig erwies, wurden die auf Grund der Folien-Schichtung gewonnenen Erkenntnisse in einer interpretierenden Zeichnung zusammenfassend dargestellt (Abb. 10). Es zeigt sich, daß es zumindest bei dem untersuchten Protoplasten eine, maximal zwei vorherrschende, große Vakuolen gibt. Diese sind (ist) in Kompartimente zerteilt, die über mehr oder weniger große Durchgänge miteinander in Verbindung stehen. Daneben existieren im corticalen Bereich der Zelle kleinere Vakuolen, deren Zugehörigkeit zu dem zentralen Vakuolensystem wegen des geringen Kontrasts der Schnitte und der Auflösung der verwendeten Rekonstruktionsmethode weder eindeutig belegt noch widerlegt werden konnte. Nach den elektronenmikroskopischen Untersuchungen ist es klar, daß im Cytoplasma weitere, vergleichsweise sehr kleine Vakuolen sind. Unter den Plasmasträngen sind einige der erwarteten tubulären, transvakuolären Stränge gefunden worden. Die Mehrheit der Stränge besteht jedoch aus "Segeln" von Cytoplasma, die die einzelnen Vakuolen- Abteilungen voneinander trennen. Diese Segel reichen im allgemeinen vom cortikalen Cytoplasma in den

Abbildung 10

Interpretierende zeichnerische Darstellung der aus den Serienschnitten (s. Abb. 9) gewonnenen Informationen über die innere Verteilung der Plasmastränge und der Vakuolen in einem Callusprotoplasten.

Die Zeichnung stellt die untere Hälfte sowie das hintere linke Viertel der Oberhälfte dar. Der Übersichtlichkeit halber wurde der Kern nicht in die Zeichnung übernommen. Die Plasmastränge stellen größtenteils Flächen dar, die unterschiedliche Kompartimente einer kompliziert verschlungenen zentralen Vakuole voneinander abtrennen. Es ist offensichtlich, daß der Callusprotoplast nicht, wie die isolierte Betrachtung einzelner Dünnschnitte vermuten ließe (s. Einsatz Abb. 7), mehrere zentrale Vakuolen besitzt, sondern nur einen Vakuolenraum, maximal zwei Vakuolenräume.



Innenraum, wo sie entweder enden oder sich mit dem perinukleären Cytoplasma vereinigen. Verzweigungen dieser Segel sind nicht selten. Es ist nicht die Funktion der Segel, einzelne mittelgroße Vakuolen vollständig voneinander zu trennen. Es scheint vielmehr, daß sie die Verbindung der verschiedenen Plasmabereiche darstellen, ohne die Einheit der zentralen Vakuole zu zerstören.

E.6. Untersuchungen an sich nicht teilenden Protoplasten

E.6.1. Besonderheiten der verwendeten Zellinien

Die in den folgenden Versuchen verwendete Hibiskus- Zellinie wurde ursprünglich an einem völlig gelben Blatt induziert, um Untersuchungen an Gerontoplasten durchzuführen. Diese etwas ungewöhnliche Herkunft scheint aber nicht die Ursache für die beobachteten Phänomene zu sein (s. E.6.5.).

Die Calluskultur wächst völlig normal auf Standardmedium (MG), regeneriert jedoch keine Pflanzen. Wurden Protoplasten aus diesem Callus isoliert, so blieben diese in geeignetem Kulturmedium bis zu 4 Wochen am Leben, was an der Plasmaströmung, der Organisation des Plasmas in Stränge und der Integrität der Zelle zu erkennen war. Vitalfärbungen mit Trypanblau und Lucifergelb lieferten die gleiche Information. Hibiskus-Protoplasten bildeten Zellwand langsamer als vergleichbare Protoplasten anderer, sich teilender Spezies. Die Mehrzahl der Zellen (60-70%) blieb rund (Abb. 11) mit geringer Calcofluor-Fluoreszenz, während der Rest (ca. 30%) sich oval verformte und starke Fluoreszenz aufwies, was auf normale Zellwandbildung hindeutet. Selten (Frequenz ca. 5×10^{-3}) konnten in einer solchen Callus- Kultur erste Teilungen beobachtet werden, die sich aber in der Regel nicht über das Zweizellstadium hinaus entwickelten. In einem einzigen beobachteten Fall gingen die Zellen erst im 8- bis 16- Zellstadium zugrunde. In keinem Falle wurde ein Callus aus

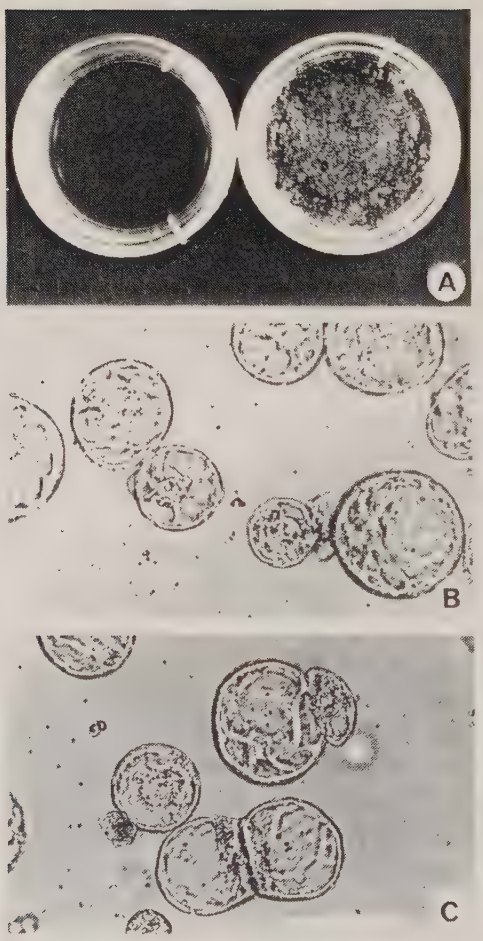
Abbildung 11

Kulturen von Hibiskus Callus- Protoplasten. (Balken: 50um)

(A) Nach 4 Wochen Kultur hatten Kontrollkulturen (kein DMSO) keinen Callus gebildet (linke Petrischale, 35mm Durchmesser). Kulturen mit 2% DMSO (rechte Petrischale) entwickelten sich dagegen normal.

(B) Typische Kontrollkulturen nach 4 Tagen: Die Protoplasten sind rund und teilen sich nicht.

(C) Typische Kulturen mit 2% DMSO nach 4 Tagen: Ovale Zellen und Teilungen sind häufig (5-25%).


A
B
C

diesen Kulturen regeneriert (Abb. 11).

Die Zellinie von N. glutinosa war ein normal wachsender Callus, und von ihm isolierte Protoplasten regenerierten problemlos zum Callus.

E.6.2. Induktion von Teilungen mittels DMSO

E.6.2.1. Hibiskus- Kulturen

Beobachtungen bei Fusionsversuchen deuteten darauf hin, daß eine Komponente des dort verwendeten Fusionsmediums eine erhöhte Teilungsrate bewirkt. Eine genauere Untersuchung dieser Beobachtung führte zur im folgenden beschriebenen Entdeckung, daß Dimethylsulfoxid (DMSO), eine der Komponenten dieses Fusionsmediums (Endkonzentration ca. 8%), Teilungen in ansonsten teilungsunfähigen Hibiskus- Protoplasten induziert.

Wenn DMSO in Konzentrationen von 2-7% bei Kulturbeginn (oder später, s.u.) ins Medium gegeben wurde, war die Zellwandsynthese leicht beschleunigt, und 5-25% der Zellen wurden zu wiederholten Teilungen angeregt (Abb. 11). Dies führte schließlich zur Regeneration normaler Callus- Kulturen, die nach einigen Wochen aus dem anfänglichen Original- Medium auf DMSO- freies Agar-Medium transferiert und dort kultiviert werden konnten. Protoplasten, die von diesen regenerierten Calli isoliert wurden, verhielten sich wie die aus dem Originalcallus isolierten Protoplasten: sie benötigten ebenfalls DMSO zur Regeneration. Ein kurzer Puls von DMSO war nicht ausreichend, um die Teilung zu induzieren: DMSO mußte mindestens während der Dauer eines Zellzyklus angeboten werden. Andererseits war der Zeitpunkt des Angebotes von DMSO nicht kritisch. Die Zellen waren noch nach mindestens 96h Vorkultur durch DMSO- Gabe zur Teilung zu bringen, wobei die Teilungsfrequenz allerdings geringfügig höher war, wenn es gleich nach der Isolierung gegeben wurde.

DMSO hatte, zusätzlich zu dem Langzeiteffekt, einen

sofortigen Effekt auf die Protoplasten: direkt nach der Zugabe von DMSO in das Medium kontrahierten die Zellen stark und erschienen extrem geschrumpft. Nach wenigen Minuten jedoch ließ dieser Effekt nach, und die Zellen sahen völlig normal aus.

Die Vermutung lag nahe, daß die Protoplasten während der Aufarbeitung geschädigt wurden, z.B. durch Unreinheiten und Nebenaktivitäten der verwendeten Enzympräparationen. Daher wurden unterschiedliche Enzyme für die Isolierung der Protoplasten verwendet. Selbst bei Verwendung der hochreinen Worthington Cellulase und Pektinase verhielten sich die Protoplasten wie oben beschrieben, so daß eine direkte Schädigung durch Verunreinigungen der Enzympräparationen weitgehend ausgeschlossen werden kann.

Da für die Wirkung von DMSO auf Zellen unterschiedlichster Art die direkte Beeinflussung der Eigenschaften der Plasmamembran berichtet wurde, wie z.B. die Lipidzusammensetzung (Lyman et al., 1976), die Membranfluidität (Haydu et al., 1977) und die Permeabilität für $^{86}Rb^{+}$-Ionen (Erdei et al., 1982), wurde eine unspezifische Erhöhung der Membranpermeabilität mittels Trypanblau und Lucifergelb überprüft. Beide Vitalfarbstoffe werden sowohl von unbehandelten als auch von DMSO- behandelten Zellen ausgeschlossen. Dies zeigt, daß die Membranpermeabilität zumindest für organische Moleküle mit mittlerem Molekulargewicht nicht unspezifisch erhöht ist. Um den Einfluß auf einige anorganische Ionen zu untersuchen, wurde die DMSO- Behandlung mit einer Behandlung mit Ionophor A 23187 verglichen. Ionophor A 23187 erhöht die Membranpermeabilität für Ca^{2+} - und Mg^{2+} - Ionen, und stellte im vorliegenden Versuch die intrazelluläre Konzentration dieser Ionen auf den (vermutlich höheren) Wert des Mediums ein. Konzentrationen im üblicherweise verwendeten Bereich (10-50uM) resultierten in erhöhter Teilungsrate und -frequenz während der ersten zwei Zellzyklen, anschließend starben die Zellen ab. Ionophor A23187 wird in DMSO gelöst verwendet. Die hier eingesetzten Endkonzentrationen von 0.1-0.5% DMSO liegen jedoch weit unter der Minimalkonzentration für den DMSO- Effekt (2%). Die

Kontrollkulturen mit DMSO entwickelten sich erwartungsgemäß zu Calli, die ohne zusätzliche Behandlung kultivierten Kontrollkulturen wiesen keine Zellteilungen auf. Nach dem Ergebnis dieser Experimente scheint die Wirkung von DMSO nicht, oder zumindest nicht ausschließlich, in der Erhöhung der Membranpermeabilität für diese zwei Ionen, Ca^{2+} und Mg^{2+}, die an der Regulation vieler zellulärer Vorgänge beteiligt sind, zu bestehen.

E.6.2.2. Colchicin- inhibierte N. glutinosa Kulturen

Da die Beobachtungen bezüglich der Zellwandsynthese und der vorübergehenden Soforteffekte eine Wirkung des DMSO auf das Cytoskelett vermuten ließen, wurden Paralleluntersuchungen an einem "künstlich" gehemmten System durchgeführt: die bereits in E.3.4. aufgeführten Hemmstoffe für Elemente des Cytoskeletts, nämlich Colchicin, Taxol, Cytochalasin B und Phalloidin, wurden auf die Revertierbarkeit ihres Effektes durch DMSO untersucht. Sie wurden in den dort genannten Minimalkonzentrationen für 100%ige Teilungshemmung verwendet. Ein interessanter Befund ergab sich bei Colchicin: hier war die Hemmung reversibel durch DMSO (s.u.).

Mikroskopische Beobachtungen weisen starke Parallelen zwischen Hibiskus- und Colchicin- gehemmten N. glutinosa- Protoplasten (1mM) auf: Die Zellen bleiben in geeignetem Medium über Wochen lebendig, die überwiegende Zahl bleibt rund, und die Zellen nehmen stark an Volumen zu. Dieser Volumenzuwachs ist bei den Colchicin- gehemmten N. glutinosa- Protoplasten stärker ausgeprägt als bei den Hibiskus- Protoplasten. Ein Unterschied besteht in der stärkeren Calcofluor- Fluoreszenz der Tabak- Protoplasten, was auf eine normale Zellwandsynthese hindeutet.

Gibt man DMSO zu derart Colchicin- gehemmten Tabak- Protoplastenkulturen, so wird je nach Konzentration ein unterschiedlicher Effekt beobachtet. Bei 2% DMSO im Medium wurden Teilungen in hoher Frequenz (10-60% gegenüber 30-80% in ungehemmten Kulturen) induziert. Bei 4% DMSO zeigten dagegen viele

Tabelle 3

Verbindung (Referenz)	Konzentration (mM)				Teilungen bei optimaler Konz.
	untersuchter Bereich	optimal	lethal	Konz. *in vitro*	
Glyzerin (Lee & Timasheff, 1977)	100-1000	300	500	1000-4000	erste
Taxol (Kumar, 1981)	0.0001-0.1	0.001-0.01	100	0.02	erste
DMSO (Robinson & Engelborghs, *1982*)	12.8-1280	256-384 (2-3%)	890	670-840	kontinuierlich

Tabelle 3. Effekt von Verbindungen, die Tubulin- Polymerisation *in vitro* fördern, auf die Induktion von Zellteilungen in sonst teilungsunfähigen Hibiskus Callus- Protoplasten

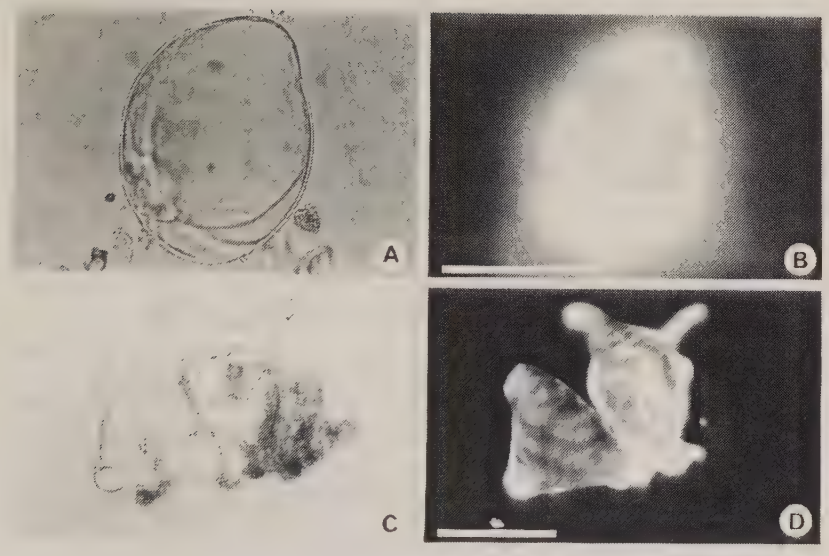


Abbildung 12

Bildung von "Wikingerhelm-" Strukturen in 4 Wochen alten Kulturen von Nicotiana glutinosa Callus- Protoplasten. (Balken: 100um)

(A) Ovale Zelle in Kulturmedium mit 1mM Colchicin (Hellfeld).

(B) Calcofluor White Fluoreszenz von (A). Das fluoreszierende Material ist gleichmäßig über die Oberfläche verteilt.

(C) "Wikingerhelm-" ähnliche Zellformen in Kulturmedium mit 1mM Colchicin und 4% DMSO.

(D) Calcofluor White Fluoreszenz von (C). Das fluoreszierende Material ist in Bändern angeordnet, was auf eine geordnete Ablagerung von Mikrofibrillen hindeutet, wie es normalerweise bei Xylogenese geschieht.

Zellen Anzeichen von Xylogenese (Abb. 12), eine Entwicklung, die bei Hibiskus- Kulturen nicht beobachtet wurde. Sie entwickelten einen bis mehrere tubuläre Auswüchse ("Wikingerhelme") und wiesen geordnete Ablagerung von CW- positivem Material auf. Diese Wikingerhelme wurden in Kulturen mit 4% DMSO (ohne Colchicin) in sehr viel geringerem Maße beobachtet. Die ringförmige Anordnung der Ablagerungen läßt eine beginnende Differenzierung zu Tracheiden vermuten. In Kontrollen, die zwar Colchicin, aber kein DMSO enthielten, wurden weder Teilungen noch Wikingerhelme beobachtet, sondern ausschließlich runde oder ovale Riesenzellen.

Die Revertierbarkeit der Colchicinhemmung in Tabak-Protoplasten durch DMSO lieferte einen Hinweis auf einen möglichen Effekt von DMSO auf Mikrotubuli auch in Hibiskus- Protoplasten.

E.6.3. Andere potentielle Induktoren

DMSO fördert in vitro die Aggregation von Tubulin zu Mikrotubuli (Himes et al., 1977, Robinson und Engelborghs, 1982). Diese Fähigkeit liefert ein weiteres Indiz dafür, daß die Wirksamkeit von DMSO in vivo ebenfalls mit einem direkten Effekt auf die Mikrotubuli zusammenhängen könnte. Deshalb wurden andere Substanzen, die ebenfalls in vitro Mikrotubuli- Aggregation bewirken, auf ihre Fähigkeit untersucht, in vivo Teilungen zu induzieren: Glyzerin, Taxol, und Deuteriumoxid. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefaßt. Glyzerin und Taxol konnten bei Konzentrationen unterhalb der Toxizitätsgrenze, ähnlich wie Ionophor A 23187, zwar die Frequenz der ersten Teilungen erhöhen, waren aber nicht in der Lage, weiteres Wachstum zu fördern. D_2O war bereits bei 50% Konzentration toxisch, was nur der halben Konzentration entspricht, die von Schnepf et al. (1976) an Sphagnum- Blättern benutzt wurde. Keine dieser Substanzen führte zu makroskopischen Calli.

Da bei Friend's Leukämie- Zellen DMSO als Induktor der

Cytodifferenzierung eingesetzt wurde (Friend et al., 1971), wurde Natriumbutyrat, eine andere Substanz, die dort eine ähnliche cytodifferenzierende Wirkung zeigt (Harel et al., 1981), auf ihr Potential zur Teilungs- oder Differenzierungsinduktion bei Protoplasten untersucht. Konzentrationen von über 5mM erwiesen sich als toxisch, während geringere Konzentrationen keine Wirkung zeigten.

E.6.4. Immunfluoreszenz- Beobachtungen

Mit Hilfe der (indirekten) Immunfluoreszenz- Technik kann der Grad der Tubulin- Aggregation und Polymerisation direkt sichtbar gemacht werden. Dementsprechend wurde diese Technik verwendet, um die Beteiligung der Mikrotubuli am DMSO- Effekt direkt zu beweisen. Da beim Fixieren ganzer Zellen die gesamte Zelle leuchtet, ohne daß spezifische Strukturen erkennbar sind (s. auch Lloyd et al., 1979, van der Valk et al., 1980), wurde auf die Präparation von Membran- Ghosts zurückgegriffen. Hierzu wurden die Zellen vor dem Fixieren mit Triton X-100 extrahiert, eine Behandlung, unter der die Mikrotubuli stabil sind (Lloyd et al, 1979).

In Kulturen, in denen keine Teilungen zu erwarten waren, d.h., in unbehandelten Hibiskus- Kulturen und in Colchicin-behandelten N. glutinosa- Kulturen, waren, wenn überhaupt, nur wenige, kurze Mikrotubuli sichtbar (Abb. 13). Die Fluoreszenzbilder wurden zudem sehr schnell durch das Anregungslicht ausgebleicht, was auf die Bindung nur weniger Antikörper hindeutet. Dagegen zeigten Protoplasten aus Kulturen, bei denen Teilungen erwartet und später auch beobachtet wurden (d.h., bei ungehemmten Tabak- Kulturen und bei DMSO- behandelten Hibiskus- und N. glutinosa/Colchicin- Kulturen), ein ausgeprägtes Netz von langen Mikrotubuli oder Mikrotubuli- Bündeln in zufälliger Anordnung. In vielen Fällen war dieses Netz sogar

Abbildung 13

Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung corticaler Mikrotubuli in Ghosts von Callus- Protoplastenmembranen. (Balken: 25um)

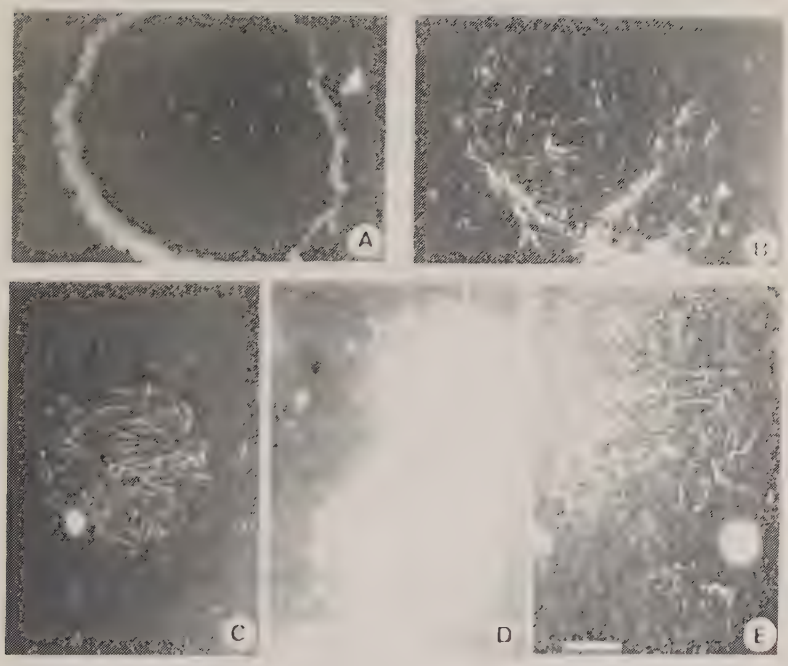
(A) Kontrollkultur ohne DMSO im Kulturmedium (Hibiskus, 16h). Nur wenige, kurze, schwach sichtbare Mikrotubuli sind vorhanden. Die ringförmige Fluoreszenz wird von unspezifischer Bindung der sekundären Antikörper verursacht, wie Kontrollkulturen ohne primäre Antikörper beweisen. Durch die Abwesenheit eines dreidimensionalen Cytoskeletts kollabiert die Zelle bei der Extraktion, und die Membranproteine können sich an der Polylysin-beschichteten Deckglas- Oberfläche anreichern. Dieses Bild wurde ausgewählt, um die Umrisse der ehemalige Zelle zu verdeutlichen.

(B) Kultur mit 2% DMSO im Kulturmedium (Hibiskus, 16h). Ein dreidimensionales Netzwerk von Mikrotubuli ist erkennbar. Durch die stützende Funktion des Cytoskeletts kollabiert die Zelle nicht, und dementsprechend können sich Membranproteine nicht am Deckglas anreichern. Keine unspezifische Fluoreszenz ist sichtbar. Der Zeitpunkt der DMSO- Zugabe ist nicht kritisch und kann bis mindestens 96h nach der Isolierung liegen.

(C) Kontrollkultur ohne Colchicin oder DMSO (N. glutinosa, 16h). Die Mikrotubuli zeigen ein normales Erscheinungsbild.

(D) Kultur mit 1mM Colchicin ab initio (N. glutinosa, 16h). Keine Mikrotubuli sind sichtbar, nur unspezifische Fluoreszenz (s. A).

(E) Kultur mit 1mM Colchicin und 2% DMSO ab initio (N. glutinosa, 16h). Ein normales Erscheinungsbild ist wiederhergestellt. Der Zeitpunkt der DMSO- Zugabe ist nicht kritisch und kann bis mindestens 96h nach Colchicin- Gabe liegen.


A
B
C
D
E

dreidimensional, trotz der Vorbehandlung der Zellen (Abb. 13), was eine Interaktion einzelner Mikrotubuli(bündel) untereinander nahelegt. Diese Fluoreszenzbilder waren auch stärker resistent gegenüber Ausbleichen, eine Beobachtung, die sich mit vermehrter Anwesenheit von Antikörper, und damit Antigen (in diesem Falle ß-Tubulin) erklären läßt.

In sich nicht teilenden Kulturen waren die Überreste der Zellen häufig von einem Kranz fluoreszierenden Materials umrundet (Abb. 13.A), wogegen dieser Effekt in sich teilenden Kulturen nur sehr selten beobachtet wurde. Der Kranz besteht vermutlich aus Membranproteinen, die an das Poly- Lysin der Deckglasbeschichtung gebunden haben und die nun ihrerseits unspezifisch Antikörper binden. Ohne das dreidimensionale Gerüst von Mikrotubuli kollabieren die Zellen vermutlich während der Extraktion, was zur Akkumulation der Zellwandproteine auf dem Deckglas führt. Die Anwesenheit des stützenden Mikrotubuli- Gerüsts verhindert dagegen die Akkumulation und damit die Ausbildung des Ringes.

Nach den fluoreszenzmikroskopischen Bildern schienen N. glutinosa- Zellen etwas weniger Mikrotubuli aufzuweisen als Hibiskus- Zellen. Dies mag genetisch bedingt sein. So zeichnen sich z.B. Zellsuspensionskulturen von Hibiskus gegenüber anderen Zellinien durch eine ungewöhnlich hohe Ausbeute von Tubulin aus(bezogen auf das Frischgewicht, D.E. Fosket, R. Cyr, persönliche Mitteilung).

In den hier beschriebenen Immunfluoreszenz- Versuchen erwiesen sich die anfangs verwendeten Antikörper gegen Rinderhirn-Tubulin als ungeeignet, da sie nicht spezifisch zu binden schienen. Dies steht im Gegensatz zu Berichten, nach denen Antikörper gegen tierisches Tubulin erfolgreich in Studien pflanzlicher Tubuline eingesetzt worden sind (z.B. Lloyd et al., 1979; 1980; Powell et al., 1980; van der Valk et al., 1980; Wick et al., 1981; De Mey et al., 1982; Lloyd, 1983; Simmonds et al., 1983; Wick et al, 1983). Bei der Unspezifität handelt es sich wohl um eine Eigenart des hier verwendeten Antikörpers.

Signifikante Mikrotubuli- Mengen ließen sich bereits 2h nach der Isolierung in Kulturen beobachten, die direkt nach der Isolierung keine Mikrotubuli aufwiesen.

Die Immunfluoreszenz- Beobachtungen zeigen, daß in den untersuchten Systemen teilungsfähige Zellen mehr und längere, möglicherweise auch in dickeren Bündeln angeordnete Mikrotubuli aufweisen als teilungsunfähige Zellen und erhärten somit die Vermutung, daß der DMSO- Effekt über einen Einfluß auf den Polymerisationsgrad der Mikrotubuli zustande kommt.

E.6.5. Ausdehnung der Ergebnisse auf andere Zelltypen

Vor dem Hintergrund der Probleme, die die Regeneration der ökonomisch wichtigsten Pflanzen aus isolierten Protoplasten bereiten, ist die Universalität des DMSO- Effektes eine wichtige Frage. Verschiedene Zelltypen wurden hierzu untersucht. Innerhalb der Spezies Hibiskus rosa-sinensis scheint das Phänomen der Teilungsunfähigkeit verbreitet zu sein, verbunden mit der Fähigkeit, durch DMSO gerettet zu werden. So wiesen Protoplasten aus Calli, die an grünen Blättern einer anderen Varietät induziert worden waren, das gleiche Verhalten auf wie die ursprünglich verwendeten.

Für Untersuchungen dieser Art werden pflanzliche Systeme benötigt, die, abgesehen von ihrer Teilungsunfähigkeit, von perfekter Qualität sind. Eine Teilungsunfähigkeit kann außer auf eine spezifische Hemmung noch viel wahrscheinlicher auf den ungünstigen physiologischen Zustand der verwendeten Zellen oder des Ausgangsmaterials zurückzuführen sein. Deshalb sollten die Protoplasten über eine längere Kulturzeit lebensfähig bleiben, was generell eine gute Qualität andeutet.

Die Rettung von Colchicin- inhibierten Zellen wurde inzwischen auch an Protoplasten aus Daucus carota-Suspensionskulturen gezeigt (R. Cyr, persönliche Mitteilung).

E.7. Immunfluoreszenz- Untersuchungen an Mesophyll-Protoplasten

Die Probleme bei der Regeneration von Mesophyllprotoplasten sind möglicherweise sehr verschieden von denen bei Callusprotopasten. In Calluszellen liegt ein ausgeprägtes System von Mikrotubuli vor, das offensichtlich in einigen Fällen, abhängig von Genotyp oder Donorgewebe, während der Isolierung von Protoplasten zerstört wird. Wahrscheinlich liegen die Monomere aber noch vor. Dagegen sind bei ausdifferenzierten Mesophyllzellen keine oder nur sehr wenige Mikrotubuli zu erwarten, weshalb in diesem Falle eine Neusynthese von Tubulin nötig wäre, die mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht durch DMSO induzierbar ist. Um diesen Sachverhalt zu klären, wurden Mesophyllprotoplasten junger, noch in der Differenzierung begriffener, und alter, ausdifferenzierter, jedoch noch nicht seneszenter Blätter direkt nach der Isolierung sowie in Intervallen während ihrer Entwicklung auf Mikrotubuli untersucht.

Junge Blätter von N. plumbaginifolia (ca. 4cm lang) lieferten Protoplasten, die direkt nach der Isolierung in der Immunfluoreszenzanfärbung ein dichtes Netz von cortikalen Mikrotubuli zeigten (Abb. 14.A). Dagegen wiesen Protoplasten von ausdifferenzierten Blättern (ca. 15cm, Rosettenblatt einer blühenden Pflanze) unmittelbar nach der Isolierung keine cortikalen Mikrotubuli auf (Abb. 14.B). Mit zunehmender Kulturdauer nahm jedoch der Gehalt an cortikalen Mikrotubuli in diesen Zellen zu (Abb. 14. C-F). Nach ca. 32h Kulturdauer glichen diese Zellen in Bezug auf die cortikalen Mikrotubuli normalen Calluszellen. Zu diesem Zeitpunkt traten in der Kultur erstmals ovale Zellen auf. Protoplasten aus älteren Blättern benötigen zur Dedifferenzierung, die immer der ersten Teilung vorangeht, beträchtlich mehr Zeit als Protoplasten aus jungen Blättern. Erste

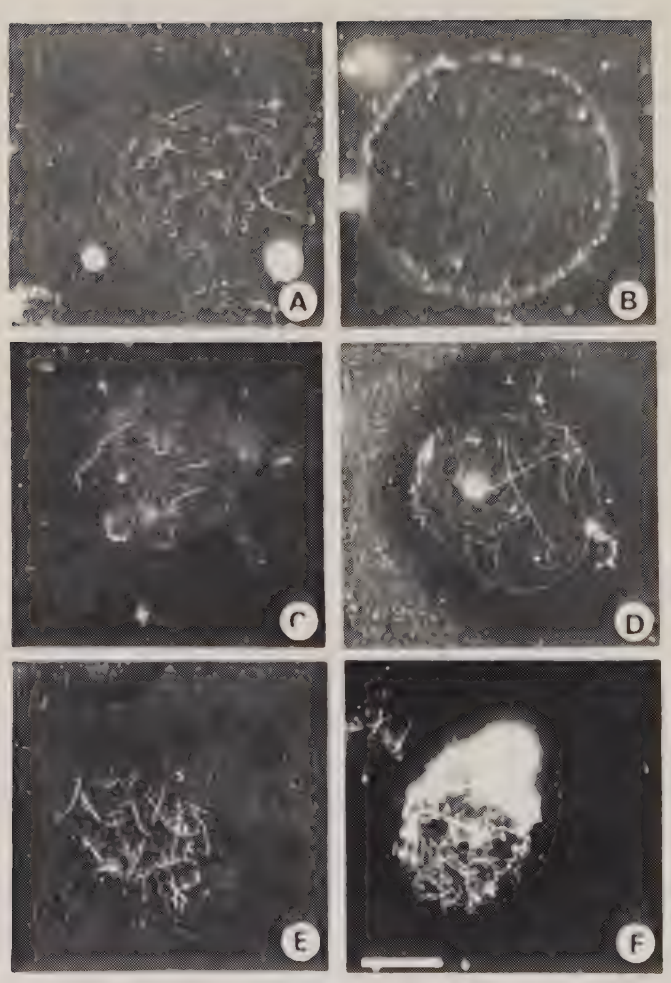
Abbildung 14

Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung cortikaler Mikrotubuli in Plasmamembran- Ghosts von Mesophyll- Protoplasten von Nicotiana plumbaginifolia. (Balken: 25um)

(A) Protoplast einer jungen Mesophyllzelle, isoliert aus einem noch nicht voll ausgewachsenen Blatt. Ein gut ausgebildetes Netz cortikaler Mikrotubuli ist unmittelbar nach der Isolierung sichtbar.

(B) Protoplast einer ausdifferenzierten Mesophyllzelle, isoliert aus einem Rosettenblatt einer blühenden Pflanze. Unmittelbar nach der Isolierung sind keine Mikrotubuli sichtbar, sondern nur unspezifische Fluoreszenz (s. Abb. 13).

(C) - (F) Protoplasten aus derselben Kultur wie in (B). Die Zahl der Mikrotubuli nimmt mit der Kulturzeit zu ((C) - 5h, (D) - 10h, (E) - 20h, (F) - 32h). Nach 32h waren ovale Zellen in der Kultur vorhanden, die ersten Teilungen konnten nach 78h beobachtet werden.


A
B
C
D
E
F

Teilungen waren hier nach 78h zu sehen, gegenüber 24h in den Kulturen von Protoplasten aus jungen Blättern.

Die Ergebnisse an isolierten Mesophyll- Protoplasten lassen nicht notwendigerweise zwingende Rückschlüsse auf die Situation im Ausgangsgewebe zu. Eventuell besitzen junge und alte Mesophyllzellen eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber der Isolierungsprozedur, ähnlich wie dies für Callusprotoplasten verschiedener Herkünfte gezeigt wurde (s. D.5.). Wenn tatsächlich ähnliche Verhältnisse vorliegen, müßte dieser Effekt jedoch Genotyp- spezifisch sein. Daher wurden neben N. plumbaginifolia noch ausdifferenzierte Mesophyllzellen folgender Spezies protoplastiert und untersucht: Brassica napus, Nicotiana tabacum und Petunia hybrida. Damit wurden insgesamt 4 Arten aus 2 Familien getestet und in allen Fällen die Abwesenheit von Mikrotubuli in isolierten Protoplasten ausdifferenzierter Mesophyllzellen gefunden (Tab. 4). Dieser Befund liefert einen starken Hinweis dafür, daß diese Zellen auch im Blattgewebe keine cortikalen Mikrotubuli enthalten (s. D.6.).

Tabelle 4

Spezies	Mikrotubuli gefunden in Mesophyllprotoplasten aus		Callus regeneriert aus Protoplasten junger und ausdifferenzierter Mesophyllzellen
	jungen Blättern	ausdifferenzierten Blättern	
Brassica napus	+	-	+
Nicotiana plumbaginifolia	+	-	+
Nicotiana tabacum	+	-	+
Petunia hybrida	+	-	+

Tabelle 4. Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung von Mesophyllprotoplasten auf den Gehalt an cortikalen Mikrotubuli.

DISKUSSION

D.1. Untersuchungen im Magnetfeld

Die Untersuchungen des Einflusses von starken Magnetfeldern auf Protoplastenkulturen und Morphogenese- induzierte Calli müssen unter Berücksichtigung der Umstände beurteilt werden, unter denen sie durchgeführt wurden. Zum einen war die relativ große Entfernung zum Max- Planck- Institut für Festkörperforschung in Stuttgart ein Hindernis. Zum anderen konnten sie nicht so ausführlich durchgeführt werden, wie es wünschenswert gewesen wäre, da der Umzug nach Californien eine Weiterführung unterband.

Es wurde kein spezifischer Einfluß des Magnetfeldes auf die Entwicklung der überlebenden Zellen gefunden. Bei einzelnen Organellen, z.B. Chloroplasten, konnte in einigen Fällen eine feldbedingte Umverteilung innerhalb der Zelle beobachtet werden.

Die erhaltenen Ergebnisse in Bezug zur Literatur zu setzen, ist schwierig, da relativ wenig Information über den Einfluß von konstanten starken Magnetfeldern auf Pflanzenzellen publiziert ist. Mehr Untersuchungen wurden mit schwachen Wechselfeldern an tierischen Systemen durchgeführt. Die Situation wird weiter kompliziert durch teilweise widersprüchliche Berichte. So scheint es z.B. unklar zu sein, ob kultivierte tierische Zellen unter dem Einfluß von Magnetfeldern transformiert werden (Malinin et al., 1976, Haigis et al., 1981). Es wird weiterhin berichtet, daß isolierte Enzyme in ihrer Aktivität von starken konstanten Magnetfeldern beeinflußt werden (so z.B. Trypsin, Cook und Smith, 1964) oder nicht beeinflußt werden (ebenfalls Trypsin, Nazarova et al., 1982). Unbestrittene Einflüsse von Magnetfeldern sind dagegen

z.B. die auch in den eigenen Experimenten beobachtete feldgerichtete Anordnung von Chloroplasten (z.B. Papp und Meszena, 1982) sowie eine Beeinflussung der quantenphysikalischen Vorgänge bei der Photosynthese (z.B. Sonneveld et al., 1981).

Bezüglich des Einflusses von starken konstanten Magnetfeldern auf Pflanzen wird der sog. Magnetotropismus beschrieben (Audus, 1960; Audus und Whish, 1964). Hierbei sind Zellteilungen an der Ausrichtung beteiligt. Keimende Lilienpollen orientieren sich ebenfalls an magnetischen Feldlinien (Sperber et al., 1981), allerdings ohne daß Zellteilungen am Entstehen des Effektes beteiligt wären. Der Wirkungsmechanismus ist in beiden Fällen unbekannt, scheint jedoch nicht ausschließlich auf diamagnetischen Kräften zu beruhen (Sperber et al., 1981).

Vor diesem Hintergrund war es nicht auszuschließen, daß sich die Entwicklung von Protoplasten oder Calli in reproduzierbarer Weise durch Magnetfelder beeinflussen läßt und sich so eine bessere externe Steuerung der Entwicklungsprozesse erreichen ließe. Dies läßt sich aufgrund der hier beschriebenen negativen Versuche auch nicht ausschließen. Möglicherweise müssen die Versuchsbedingungen weiter optimiert werden, insbesondere kann die angewendete Feldstärke durchaus kritisch sein. Markov (1981) erklärt die Wirkung von Magnetfeldern auf biologische Systeme mit einer Veränderung der Wasserstruktur. Diese Veränderung ist ein resonanzabhängiges Phänomen und tritt deshalb nur bei bestimmten Feldstärken auf. Auf diesen Umstand führt Markov die Inkonsistenz der publizierten Ergebnisse zurück, sicherlich nicht die einzig mögliche Theorie. Eine weitere Theorie wurde z.B. von Lyu (1980) vorgeschlagen. Hiernach sollen veränderte Eigenschaften des O_2-Moleküls die Ursache der biologischen Effekte starker Magnetfelder sein.

D.2. Zellwandbildung bei isolierten Protoplasten

Der Befund, daß sich isolierte Protoplasten höherer Pflanzen in Gegenwart nennenswerter Konzentrationen des Fluoreszenzfarbstoffes Calcofluor White normal entwickeln, bedeutet nicht nur, daß die Topologie der Zellwandsynthese am lebenden Objekt verfolgt werden konnte, sondern auch, daß der Einfluß des Farbstoffes auf das frisch synthetisierte Wandmaterial sichtbar wurde. Man muß sich allerdings der Grenzen der Methode bewußt sein, insbesondere die frühen Vorgänge der Zellwandbildung betreffend. Williamson et al. (1977) fanden, daß Vicia hajastana-Protoplasten bereits nach 20 Minuten elektronenmikroskopisch sichtbare Fibrillen zeigten und nach 1h von einem dichten Netz umhüllt waren, aber noch keine erkennbare CW- Fluoreszenz aufwiesen. Andererseits ist es in dieser Arbeit gelungen, die Auflösung der CW- Methode zu erhöhen. Es wurden Strukturen sichtbar gemacht, die in der Größenordnung von einer bis wenigen Mikrofibrillen liegen.

Das Zellwandmaterial, das von Tabak- Protoplasten neu gebildet wird, besteht außer aus ß-1,4 Glucan (entspricht weitgehend Zellulose) noch aus ß-1,3 Glucan (Herth und Meyer, 1977). Beide Substanzen fluoreszieren mit CW. Da Cellulase diese Fluoreszenz vollständig entfernt, kann man auf eine vorherrschende Rolle von Zellulose schließen. Es ist jedoch zu bedenken, daß die kommerziell verfügbaren Cellulase- Präparationen noch beträchtliche Nebenaktivitäten enthalten, die für die Entfernung anderer Stoffklassen verantwortlich sein könnten.

Das frisch gebildete Material bzw. dessen nichtfibrilläre

Komponente wird durch die Anwesenheit von CW in der Kristallisation gehindert. Dies ist durch die Difluorezenz- und durch die Laser- mikrochirurgischen Untersuchungen belegt. Ähnliche Beobachtungen wurden an niederen Organismen gemacht, z.B. bei Acetobacter xylinum (Benziman et al., 1980) und Acanthosphaera (Schnepf et al., 1982). In Poterioochromonas stipitata (Herth, 1980) wird die Bildung von Chitin- Mikrofibrillen ebenfalls durch CW unterbunden. Die Hemmung der Kristallisation neusynthetisierten Zellwandmaterials ist nicht auf CW beschränkt, sondern scheint unter zellwandbindenden Farbstoffen weit verbreitet zu sein. So werden entsprechende Effekte z.B. für Congorot berichtet (s. z.B. Herth, 1980, für Poterioochromonas, und Burgess und Linstead, 1982, für Moosprotoplasten).

Da CW nicht das Plasmalemma permeiert, muß aus unseren Beobachtungen geschlossen werden, daß das frisch gebildete nichtfibrilläre Zellwandmaterial in einem amorphen Zustand synthetisiert wird und dann durch die Bindung an das Farbstoffmolekül an der Kristallisation gehindert wird. Somit scheint die Synthese von Zellulose in zwei unabhängigen Schritten erfolgen zu können: (1) Polymerisation der Kohlenhydrat- Monomere und (2) Kristallisation der Polymere. Ähnliche Beobachtungen sind bereits an anderen Organismen gemacht worden, (Benziman et al., 1980; Herth, 1980), hier jedoch erstmalig für Zellen höherer Pflanzen beschrieben.

Die Zellwandbildung scheint bei Protoplasten auf mindestens zwei Ebenen gleichzeitig zu verlaufen. Einerseits werden die Fibrillen gebildet, die sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von CW kristallin vorliegen und mehr oder weniger gleichmäßig über die gesamte Oberfläche verteilt abgelagert werden. Andererseits bilden sich gleichzeitig und unabhängig davon

an diskreten Punkten voluminösere Strukturen, die in ihrer Kristallisation von CW beeinflußbar sind. Beide Formen werden von der reinsten kommerziell verfügbaren Cellulase (Worthington) vollkommen abgebaut. Dies läßt vermuten, daß es sich jeweils um das gleiche Material in unterschiedlichem Zustand handelt. Obwohl die Fibrillen in einigen Fällen etwas von der Oberfläche abstehen können (Abb. 2.C), sind sie doch annähernd ausschließlich in einer Ebene parallel zur Membran angeordnet. Das voluminösere Material scheint dagegen im Regelfalle vom Ort seiner Synthese über die Oberfläche ausgebreitet oder möglicherweise durch mobile Synthesekomplexe, wie sie von Heath (1974) für höhere Pflanzen vorgeschlagen wurden, während der Synthese auf der Oberfläche verteilt zu werden. Ist die Beweglichkeit dieses Syntheseapparates oder sind etwaige andere Mechanismen gestört, so treten die beobachteten Mißbildungen auf, bei denen Material in das Medium ausgeschieden wird. Obwohl diese Mißbildungen in Protoplastenkulturen relativ häufig zu beobachten sind, mag dies für Zellen im Gewebeverband irrelevant sein, da hier Nachbarzellen bzw. Phasengrenzen das Zellwandmaterial sammeln und formen können.

Die Beobachtungen an ab initio CW gefärbten Protoplastenkulturen untermauern die These, daß eine Zellwand, oder zumindest eine zellwandähnliche Umhüllung, vorhanden sein muß, bevor eine Zellteilung stattfinden kann (diskutiert bei Schilde-Rentschler, 1977). Diese Zellwand muß jedoch nicht vollständig kristallin sein, wie auch von Meyer und Abel (1975) berichtet wurde.

Die genetische Analyse der aus CW- Cokulturen regenerierten Pflanzen ergab, daß diese Pflanzen, im Rahmen der Untersuchung, normal sein können. Zwar zeigte eines der Regenerate schlechten Samenansatz und Kleinwüchsigkeit, doch da die Nachkommen normales

Verhalten zeigten, ist dies auch durch Gewebekultureffekte erklärbar. Effekte dieser Art sind bei regenerierten Pflanzen häufig beobachtbar (Sacristan und Melchers, 1969; Burk und Matzinger, 1976; Übersicht über "Somaclonale Variation" bei Scowcroft und Larkin, 1982). Das Ergebnis dieser Analyse unterstreicht die Unschädlichkeit der CW- Behandlung und läßt auf eine unbedenkliche universelle Verwendbarkeit der ab initio CW-Kultur auch bei anderen Fragestellungen schließen, wie z.B. Einflüsse von Feldeffekten auf Zellwandbildungsprozesse.

D.3. Plasmastränge, Plasmaströmung und Protoplastenform; Laser- Microchirurgie

Laser- und UV- Mikrostrahlen sind wirkungsvolle methodische Ansätze für die subzelluläre Chirurgie. Sie sind bereits an verschiedenen Zelltypen erfolgreich angewendet worden (z.B. s. Uretz et al., 1954; Berns et al., 1981; Leslie und Pickett-Heaps, 1983). Kamitsubo (1972) benutzte einen konventionellen Weißlicht-Mikrostrahl von relativ großem Durchmesser, um Chloroplasten aus der cortikalen Schicht einer Characeen- Zelle zu entfernen und so durch ein Fenster Einblick in das Zellinnere zu erhalten. Die vorliegende Arbeit beinhaltet die erste Anwendung eines Laser-Mikrostrahls auf Zellen höherer Pflanzen. Das hier verwendete System besitzt eine Reihe von Vorteilen gegenüber den zur Erforschung der Plasmaströmung meist verwendeten Riesenzellen einiger Algen. Insbesondere erlaubt die Abwesenheit einer Zellwand, Interaktionen zwischen Plasmaströmung und Zellform zu beobachten, und es ist problemlos, die Experimente an einer großen Zahl von Zellen durchzuführen. Der Laserstrahl ermöglicht eine

weitaus höhere Präzision der Mikrochirurgie im Vergleich zu anderen mikrochirurgischen Methoden.

Wenn Cytoplasmastränge mit dem Laser- Microstrahl durchtrennt wurden, waren die ersten sichtbaren Änderungen das Zurückziehen der Strangenden und das Verschwinden der Einschnürungen im Umfang der Zelle. Es scheint, daß der Schuß Strukturelemente zerstörte, die dem Strang Zusammenhalt geben, und eine innere Spannung die nun beobachtbaren Prozesse in Gang setzt. Da diese spannungsbedingten Folgen des Schusses nur bei Zellen zu beobachten waren, die auch heftige Plasmaströmung zeigten, nicht aber bei solchen, bei denen keine Strömung festgestellt wurde, scheint diese Spannung nicht eine inhärente Eigenschaft des Cytoplasmas zu sein, sondern eher eine Eigenschaft, die es unter bestimmten Bedingungen annehmen kann und die mit Plasmaströmung einhergeht.

Die Durchtrennung eines Hauptstranges bringt die Strömung in der gesamten Zelle zum Erliegen und resultiert im Verlust der dreidimensionalen makroskopischen Organisation des Plasmas. Diese Beobachtung ist insbesondere deshalb interessant, weil der Laser-Schuß nur einen winzigen Teil der Zelle direkt erfaßt. Es scheint also ein System in der Zelle zu existieren, das Verletzungen dieser Art zu anderen Teilen der Zelle kommuniziert. Dieses System könnte z.B. aus einem Netzwerk von Strukturelementen bestehen, insbesondere aus Mikrofilamenten, das im hypothetischen Fall durch die innere Spannung in einer bestimmten Ordnung gehalten wird. Wird diese Spannung gelöst, geht die Ordnung verloren. In diesem Zustand wird statt geordneter Strömung Brown'sche Molekularbewegung beobachtet. Dieser Effekt erinnert an die Beobachtungen von Wolosewick und Porter (1977), die in ihren Zellen durch Kältebehandlung ein Erschlaffen des mikrotrabäkulären

Netzwerkes induzieren und nur unter diesen Bedingungen Brown'sche Molekularbewegung beobachten konnten.

Wurde der Zusammenbruch von Strömung und cytoplasmatischer Struktur durch die Verletzung einer Vakuole und die vermutlich damit einhergehende drastische intrazelluläre pH- Veränderung hervorgerufen, trat keine Brown'sche Molekularbewegung auf. Offensichtlich resultiert diese Behandlung in koaguliertem, nicht aber erschlafftem, Plasma und ist daher ein qualitativ anderes Phänomen als das durch Reißen eines Hauptstranges induzierte.

Der Verlust der Strömung in der gesamten Zelle durch ein Erschlaffen der inneren Spannung läßt sich so vorstellen, daß z.B. die Mikrofilamente im entspannten Plasma nicht genügend Widerlager vorfinden (bieten), um die Strömung aufrecht zu erhalten. Während die Zelle aktiv die innere Struktur und Spannung wieder aufbaut, erhalten (bieten) auch die Mikrofilamente mehr und mehr Widerlager, so daß die Strömung wieder aufgenommen werden kann. Diese Ansicht wird durch die Beobachtung unterstützt, daß die Wiederaufnahme der Strömung allmählich und über ein richtungsloses Stadium zu einer strengen Organisation vonstatten geht.

Unter all den verschiedenen Strukturelementen, die für den Zusammenhalt der Stränge und den Aufbau von Spannung in Frage kommen, scheinen für die vorliegenden Reaktionen hauptsächlich Mikrofilamente verantwortlich zu sein. Dies wird durch die Hemmungs- Experimente mit Cytochalasin B (positiv) sowie Phalloidin, Colchicin und Taxol (negativ) deutlich. In der Tat sind Aktin- und Myosin- ähnliche Proteine aus höheren Pflanzen isoliert worden (Vahey et al., 1982). Die ursächliche Rolle von Mikrofilamenten bei der cytoplasmatischen Strömung ist für andere grüne Pflanzen bereits vorgeschlagen worden, z.B. für Avena (Bradley, 1973), Nitella (Shimmen und Tazawa, 1982) und Chara

(Nagai und Kamiya, 1977; Nothnagel et al. 1981; Williamson, 1972). Obwohl der molekulare Wirkungsmechanismus von Cytochalasin B unbekannt ist, sind seine Einflüsse auf Mikrofilamente unbestritten (s. auch Bradley, 1973; Williamson, 1972; Nothnagel et al., 1981). Die beobachteten morphologischen Veränderungen nach Laser- bzw. Cytochalasin- Behandlung sind so ähnlich, daß der Schluß gerechtfertigt erscheint, es handle sich um das gleiche Phänomen.

Auf molekularer Ebene sind die Auswirkungen eines hochenergetischen Laserpulses auf biologisches Material noch nicht im Detail geklärt. Es kann als gesichert angesehen werden, daß bei der Bestrahlung mit der verwendeten Energiedichte neben normaler Lichtabsorption auch andere Effekte beteiligt sind (Berns et al., 1981). Die Induktion von Aktionspotentialen oder eine Veränderung der Ionenzusammensetzung des Plasmas auf Grund von Membran-Schocks erscheint hierbei als Folge des Laser- Pulses nicht ausgeschlossen. Effekte dieser Art bringen in Zellen der Characeae die Strömung zum Erliegen (Kishimoto und Akabori, 1959; Hayama et al., 1979), könnten daher u.U. auch im vorliegenden Experiment einen ursächlichen Einfluß auf die beobachteten Phänomene ausüben.

Ein weiteres interessantes Ergebnis der Laser- Mikrochirurgie ist die Beobachtung, daß Pflanzenzellen in der Lage sind, ihre Form selbst aktiv zu bestimmen, offensichtlich unter Energieaufwand. Normalerweise wird die Form pflanzlicher Zellen durch die Zellwand bestimmt, und die Entfernung derselben bewirkt bei geeigneter osmotischer Stabilisierung die Annahme einer Kugelform. Abweichungen von der Kugelform wurden bisher als Zeichen unvollständiger Protoplastierung angesehen, wobei Zellwandreste für die Deformationen verantwortlich seien. Die Laser- Versuche belegen jedoch, daß die beobachtete Form von

Protoplasten rein von internen Kräften abhängig ist. Zusätzlich wurde mittels Elektronenmikroskopie abgesichert, daß keine Zellwandreste auf der Zelloberfläche sichtbar waren.

Wie die innere Spannung auf die äußere Form übertragen wird, ist noch unklar. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen geben hierüber keinen Aufschluß. Insofern wäre es naheliegend, den Zusammenhalt des Cytoplasmas, wahrscheinlich unter Beteiligung des Cytoskeletts, als Ursache für die Einschnürungen zu postulieren. Die Membran würde sich dann den veränderten Gegebenheiten anpassen. Andererseits sind, zumindest in tierischen Zellen, Proteine beschrieben, die die Membran am Cytoskelett verankern, nämlich Spektrin, Fodrin und Ankyrin (z.B. Bennett, 1978; Branton et al., 1981; Burridge et al, 1982). Ähnliche Proteine könnten auch in Pflanzenzellen eine Rolle spielen.

Die Induktion von Fusionen mittels Laser- Mikrostrahl ist trotz noch bestehender technischer Schwierigkeiten sowohl aus theoretischen als auch aus praktischen Erwägungen von Bedeutung. Bei der Elektrofusion von Protoplasten (Zimmermann und Scheurich, 1981) ist der vorgeschlagene Mechanismus eine durch das Erreichen der Zusammenbruch- ("Breakdown"-) Spannung hervorgerufene, lokal begrenzte Störung der Lipidstruktur. Ist der Durchmesser der Störung größer als der Abstand zweier eng benachbarter Membranen, so ist die Zeitkonstante der Brückenbildung zwischen den Membranen kleiner als die der Selbstheilung innerhalb einer Membran, so daß sich winzige Poren bilden. Da diese Poren auf Grund der starken Membrankrümmung thermodynamisch instabil sind, breitet sich die Fusion über die ganze Zelle aus. (Zimmermann, 1982; Zimmermann und Vienken, 1982). Ein solcher Mechanismus wäre auch für die Laser-induzierte Fusion der plausibelste Mechanismus.

Die weitaus überwiegende Anzahl der Elektrofusionsexperimente

ist an Mesophyllprotoplasten durchgeführt worden, deren Inneres durch die cortikale Schicht von Chloroplasten mikroskopisch nicht sichtbar ist. Daher liegen noch keine Informationen über die Auswirkungen der Elektrofusion auf das Cytoplasma vor. Es erscheint sinnvoll, laserinduzierte und elektrisch induzierte Fusionen vergleichend an Callusprotoplasten durchzuführen. Beide Methoden bieten den Vorteil, daß die Zellen während der Fusion beobachtet werden können, und so unmittelbar auftretende Veränderungen beobachtet werden können. Eine Anfärbung der Cytoplasmata beider Zellen mit unterschiedlichen, z.B. Mitochondrien- spezifischen (Fluoreszenz-) Farbstoffen, wie Rhodamin 123 und Rhodamin 6G (Siemens et al., 1982) wäre möglich. Dies würde eine einfache Möglichkeit darstellen, Mischungsvorgänge der beiden Cytoplasmata zu verfolgen, und würde andere Informationen liefern als die üblicherweise durchgeführte Membranmarkierung (Galbraith und Galbraith, 1979; Zachrisson und Bornmann, 1984).

D.4. Dreidimensionale Rekonstruktion eines Callus-Protoplasten

Die mikrochirurgischen Untersuchungen warfen die Frage der intrazellulären Organisation auf. Überraschenderweise gibt die Literatur hier nur sehr unvollständig Auskunft (z.B. Palevitz, 1980; Alberts et al., 1983). Sind es tubuläre Plasmamassen, die die Vakuole(n) durchqueren? Oder sind es vielmehr Segel, die einzelne Vakuolen voneinander trennen? In diesem Falle würde das Reißen eines Stranges gleichzeitig die Fusion der Vakuolen mit sich bringen.

In isolierten Dünn- oder Ultradünnschnitten vermitteln Callusprotoplasten den Eindruck, mehrere Vakuolen zu enthalten, die durch Plasmastränge oder -segel getrennt sind. Entsprechend wäre die beobachtbare, gegenüber Mesophyllprotoplasten erhöhte Stabilität durch das Vorhandensein mehrerer kleiner, und nicht einer großen Vakuole erklärbar. Die Rekonstruktion der Serienschnitte zeigt dagegen eindeutig, daß die Vakuolenräume miteinander in Verbindung stehen, oder anders ausgedrückt, daß die Plasmastränge oder -segel nicht einzelne, unterschiedliche Vakuolen, sondern nur Kompartimente einer Vakuole voneinander trennen. Die beiden beobachteten Formen - Stränge und "Halbsegel" (die die Zelle nur teilweise durchziehen) - unterscheiden sich von dem postulierten Aufbau aus Segeln (die die Zelle ganz durchspannen und verschiedene Vakuolen voneinander trennen) prinzipiell dadurch, daß erstere bei ihrem Verschwinden keine Vakuolenfusion erforderlich machen, während bei dem Verschwinden eines Segels, das zwei unabhängige Vakuolen voneinander trennt, diese Vakuolen zwangsläufig miteinander fusionieren müßten. Dies läßt die Geschwindigkeit und Häufigkeit, mit der Umlagerungen von Strängen auch ohne mikrochirurgische Eingriffe stattfinden, einfacher verstehen, als wenn eine ständige Vakuolen-Umorganisation damit einherginge.

Trotzdem bleibt es erstaunlich, daß sich sowohl unter natürlichen Bedingungen, als auch nach mikrochirurgischen Eingriffen die Zahl der Plasmastränge (im umfassenden Sinne) so leicht verändert. Denn damit verändert sich auch die gesamte Grenzfläche zwischen Plasma und Vakuole, und somit auch die Menge von Tonoplasten- Material, das benötigt wird, um diese Fläche zu bedecken. Dieses Erfordernis läßt unter natürlichen Bedingungen einen empfindlichen Regulationsmechanismus vermuten, der Auf- und

Abbau cytoplasmatischer Stränge balanciert. Wird das Gleichgewicht durch z.B. einen Laserschuß stark zugunsten des Abbaus verschoben, gerät offensichtlich das ganze System in Unordnung, was sich in einem totalen Zusammenbruch der Struktur äußert. Eine Regulation ähnlicher Art ist für die Plasmamembran vorgeschlagen worden (Wolfe und Steponkus, 1983). Hier soll ein Reservoir von Membranmaterial existieren, vermutlich in Form von Vesikeln, das bei notwendigen Wechseln der Oberfläche, z.B. durch veränderte osmotische Verhältnisse, den Ausgleich schafft. Ein solches System wäre auch für den Tonoplasten denkbar.

Es wäre interessant, mittels ultrastruktureller Untersuchungen der Natur dieses postulierten Regulationsme- chanismus nachzugehen.

D.5. Teilungsinduktion in nichtteilenden Protoplasten

Untersuchungen an sich nicht teilenden Protoplasten sind insofern heikel, als sichergestellt sein muß - wie in anderen negativen Systemen auch -, daß die beobachteten Phänomene auf spezifischen Eigenarten des Systems beruhen und nicht auf der Qualität des verwendeten Materials. Geeignete, obwohl zum Teil subjektive, Kriterien für eine gute Qualität sind z.B. das Aussehen der Protoplasten direkt nach der Isolierung und ihre Überlebensfähigkeit über längere Kulturzeiten ohne nennenswerte Degeneration. Des weiteren kann die Fähigkeit herangezogen werden, einige der frühen Entwicklungsschritte zu durchlaufen, wie z.B. die Zellwandsynthese. Sind die Protoplasten nicht in der Lage, unter den verwendeten Kulturbedingungen wenigstens zu überleben, ist nicht zu erwarten, daß exogene Einflüsse eine weitere

Entwicklung induzieren können. In diesem Falle wäre es sinnvoll, zunächst einmal die Kultur- und Isolationsbedingungen zu optimieren.

Die verwendete Hibiskus- Zellinie erfüllte die oben genannten Kriterien und wurde deshalb als Modellsystem benutzt.

Der Versuch, DMSO in das Kulturmedium zu geben, lag nach der Beobachtung nahe, daß DMSO- haltige Fusionsmedien (Haydu et al., 1977) einen teilungsstimulierenden Einfluß auszuüben schienen. DMSO könnte nach dem Waschvorgang in signifikanter Menge ins endgültige Kulturmedium verschleppt werden. Die systematische Verfolgung dieser Beobachtung führte zur Induktion von Teilungen und schließlich zur bis dahin nicht beobachteten Regeneration von Calli in Hibiskus- Kulturen.

DMSO weist biologische Effekte unterschiedlichster Art auf. Der bekannteste dürfte seine Verwendung als Kryoprotektor sein (z.B. Towill, 1981). Weiter induziert es Differenzierung in den sogenannten Friend- Zellen (eine virusinduzierte Erythroleukämie-Zellinie, Friend et al., 1971; Kluge et al., 1976). Es beeinflußt das motorische Verhalten (Grebecka und Kalinina, 1979) und die Cytokinese (Fukui, 1980) in amöboiden Zellen und aktiviert unter bestimmten Bedingungen die Sporenkeimung von Dictyostelium (Cotter et al., 1976). Daneben sind DMSO- induzierte Änderungen einiger Membraneigenschaften und der Membranzusammensetzung beschrieben (z.B. Lyman et al., 1976; Barnett, 1978; Mager und Bernstein, 1978; Harel et al., 1979; Fishman et al., 1981; Erdei et al., 1982). DMSO scheint auch direkte Einflüsse auf Nukleinsäuren auszuüben, so z.B. auf den Methylierungsgrad der Epstein- Barr Virus DNA (Larocca et al., 1981) und das RNA/Protein Verhältnis in Friend- Zellen (Harel et al., 1981). Im zellfreien System induziert DMSO die Selbst- Assoziation von Tubulin zu Mikrotubuli,

selbst in Abwesenheit von sonst notwendigen Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAP's) (z.B. Himes, 1977).

Die Beobachtungen an Hibiskus- Protoplasten deuteten als weitere Einflußmöglichkeit auf Effekte am Cytoskelett. Die Untersuchungen mit Hemmstoffen an N. glutinosa Kulturen engten den Kreis der möglicherweise beteiligten Strukturen weiter ein. Immunfluoreszenz- Untersuchungen sicherten schließlich einen Effekt von DMSO auf das System der Mikrotubuli ab. Damit ist der primäre Ort der Wirkung zwar noch nicht bekannt - der Effekt auf die Mikrotubuli mag ein Sekundäreffekt sein -, jedoch scheint ein intaktes System von cortikalen Mikrotubuli eine notwendige Voraussetzung für eine Zellteilung zu sein. Der Effekt von DMSO auf die Mikrotubuli- Assoziation könnte durch zwei Mechanismen erklärt werden: (i) Eine Erhöhung im Pool von unpolymerisiertem Tubulin, d.h. eine Neusynthese, könnte das Gleichgewicht in Richtung auf mehr polymerisierte Mikrotubuli verschieben. (ii) Die Herabsetzung der kritischen Konzentration für die Polymerisation hätte den gleichen Effekt, würde aber eine direktere Wirkungsweise darstellen. Sowohl die Revertierbarkeit der Colchicinhemmung als auch der Effekt von DMSO auf Tubulin in vitro, sprechen eher für die zweite Möglichkeit, da in beiden Fällen eine Tubulin- Synthese unwahrscheinlich bzw. ausgeschlossen ist.

Die Induktion von Differenzierungsvorgängen in N. glutinosa Protoplasten, nämlich Xylogenese, läßt sich ebenfalls auf eine Beteiligung der Mikrotubuli zurückführen. Mehrere Theorien besagen, daß Zellulose- Mikrofibrillen zumindest in einigen Fällen während ihrer Bildung durch cortikale Mikrotubuli in ihrer Richtung festgelegt sind (für eine Übersicht dieses sogenannten "Microtubule- Microfibril Syndrome" siehe Robinson und Quader, 1982). In Colchicin- gehemmten Zellen, die im Regelfall Kugelform

aufweisen, scheint die Induktion von Mikrotubuli insbesondere durch höhere Konzentrationen (4%) die Ausbildung stark elongierter Zellen oder Zellteile zu ermöglichen, während niedrigere Konzentrationen (um 2%) eher die Zellteilung stimulieren.

Es erscheint paradox, daß Zellen sich im Zellverband eines Callus wiederholt und schnell teilen können, isolierte Protoplasten diese Fähigkeit jedoch bei einigen Genotypen verloren haben. Offensichtlich hat hier die Isolationsprozedur einen negativen Einfluß. Die Natur dieses Einflusses ist noch unbekannt, doch erscheinen folgende Möglichkeiten plausibel: (i) Die verwendeten Enzyme enthalten Verunreinigungen und enzymatische Aktivitäten, die die Zelle schädigen. Diese Möglichkeit erscheint beim vorliegenden Problemkreis durch die gleiche Reaktion gegenüber unterschiedlichen Enzympräparationen, einschließlich der hochreinen Worthington Cellulase, relativ unwahrscheinlich. (ii) Die mit der Entfernung der Zellwand einhergehende Formveränderung bewirkt auch eine Umorientierung der cortikalen Mikrotubuli (Lloyd et al., 1980). Möglicherweise ist dies bei einigen Zelltypen mit dem Zusammenbruch des cortikalen Netzwerkes verbunden, und diese Zellen sind dann nicht mehr in der Lage, den Schaden zu reparieren. (iii) Die enzymatische Verdauung der Zellwand setzt niedermolekulare Verbindungen frei (Elicitoren), die von der Zelle erkannt oder aufgenommen werden und auf die sie u.a. möglicherweise mit Abbau der corticalen Mikrotubuli reagiert, u.U. sogar mit der sogenannten hypersensitiven Reaktion (Selbstmord) (Albersheim et al., 1983; Nothnagel et al., 1983; Darvill und Albersheim, 1984).

Die hier beschriebenen Experimente kreisen erstmalig die Natur eines zellulären Blockes in teilungsunfähigen Protoplasten ein. Darüber hinaus war es möglich, diesen Block experimentell

aufzuheben. Wie universell diese Therapie ist, kann erst nach weiteren Untersuchungen an einer großen Zahl verschiedener Zelltypen entschieden werden. Da die Optimierung der Kulturbedinungen für jede neu in Kultur genommene Spezies einen großen Zeitaufwand bedeutet und die besonders interessanten Getreide auch besonders problematisch sind, wurde im Rahmen dieser Arbeit kein breit angelegtes Screening durchgeführt. Es scheint jedoch, daß im Falle von Mesophyll- Protoplasten eine grundsätzlich andere Situation vorliegt, da zumindest ausdifferenzierte Mesophyllzellen, im Gegensatz zu Calluszellen, keine cortikalen Mikrotubuli besitzen (s. D.6.) und daher in ihren isolierten Protoplasten keine Tubulin- Monomere zu erwarten sind.

D.6. Immunfluoreszenz von Mikrotubuli in Mesophyll-Protoplasten

Mesophyllprotoplasten scheinen in Bezug auf den Besitz cortikaler Mikrotubuli heterogen zu sein. In jungen Blättern befinden sich die meisten Zellen noch in Teilung oder zumindest noch im Elongationsstadium, betreiben also intensiv die Ablagerung von geordneten Zellulose- Mikrofibrillen. An beiden Vorgängen sind mit hoher Wahrscheinlichkeit Mikrotubuli beteiligt. Erwartungsgemäß lassen sich aus diesen Blättern Protoplasten gewinnen, die ein Netzwerk von cortikalen Mikrotubuli aufweisen, das sehr an die Situation in Callus- Protoplasten erinnert. Dagegen teilen sich in alten Blättern, wenn überhaupt, nur noch sehr wenige Zellen, und auch die Zellwandsynthese ist weitgehend abgeschlossen. Damit besteht theoretisch keine Notwendigkeit mehr für cortikale Mikrotubuli. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese

werden in Protoplasten, die aus voll entwickelten Blättern isoliert wurden, keine Mikrotubuli gefunden. Bevor eine Teilung einsetzen kann, muß das Netzwerk cortikaler Mikrotubuli jedoch auch in Mesophyll- Protoplasten wiederhergestellt werden. Mesophyll- Protoplasten durchlaufen in Kultur zunächst einen Dedifferenzierungsprozess, in dem u.a. Chloroplasten zu Proplastiden werden, die Zellwand wiedergebildet wird, die Zelle eine ovale Form annimmt, der Kern seine Lage verändert und sich Plasmastränge ausbilden, während viele dieser Vorgänge in Callusprotoplasten nicht stattfinden, da die entsprechenden Bedingungen bereits vorliegen. Dementsprechend setzen Teilungen in Kulturen von Callus- Protoplasten sehr rasch ein, teilweise bereits innerhalb der ersten 24h. Mesophyllzellen brauchen je nach Herkunft unterschiedlich lange Dedifferenzierungszeiten. Protoplasten aus Sproßkulturen oder sehr jungen Blättern erreichen häufig die kurzen Zeiten von Callus- Protoplasten, während die aus ausdifferenzierten Blättern sehr viel länger brauchen.

Diese Beobachtung in Verbindung mit dem Vorhandensein bzw. Fehlen von cortikalen Mikrotubuli deutet darauf hin, daß der Dedifferenzierungsprozess zumindest zum Teil durch die Bildung cortikaler Mikrotubuli gekennzeichnet ist. Es ergibt sich eine Parallele zu den Hibiskus- Callusprotoplasten und den Colchicin-gehemmten N. glutinosa- Protoplasten, denn in allen drei Fällen verhindert die Abwesenheit cortikaler Mikrotubuli die Teilung. Die Unterschiedlichkeit dieser drei Systeme läßt eine universelle Bedeutung des beschriebenen Sachverhaltes vermuten.

Über den Mechanismus, der dem Einfluß der cortikalen Mikrotubuli auf die Teilungsfähigkeit zugrunde liegt, kann hier nur spekuliert werden. Es scheint eine Rückkopplung in der Regulation der Tubulin- Biosynthese zu geben, derart, daß die

Poolgröße unpolymerisierten Tubulins einen Einfluß auf die Expression der Tubulingene (Übersicht bei Cleveland, 1983) sowie auf die DNA- Replikation hat (Crossin und Carney, 1981). So mag das Erscheinen cortikaler Mikrotubuli in dem hier beschriebenen Fall lediglich einer Speicherfunktion entsprechen. Sie verschwinden während der Mitose wieder und werden vermutlich zu dem Präprophase- Band, den Spindelmikrotubuli und dem Phragmoplasten umgebaut (Schmit et al., 1983).

Die Abwesenheit von Mikrotubuli im Protoplasten kann entweder bedeuten, daß auch die Ausgangszelle keine Mikrotubuli besitzt oder daß sie während der Aufarbeitung verloren werden. Die letztere Annahme ist jedoch wegen der Stabilität der Mikrotubuli in Protoplasten aus jungen Blättern sowie aus Mesophyll-induziertem Callus relativ unwahrscheinlich. Außerdem wurden die Befunde in mehreren Arten gemacht, sodaß auch aus diesem Grund die Annahme gerechtfertigt erscheint, daß auch im Blatt keine Mikrotubuli vorliegen. Diese These wird dadurch weiter erhärtet, daß z.B. Zellen des Calyptrogens der Wurzelspitzen von Lepidium sativum mit zunehmendem Alter weniger cortikale Mikrotubuli aufweisen (Hensel, 1984).

Die Abwesenheit cortikaler Mikrotubuli in ausdifferenzierten Mesophyllzellen stellt einen starken Hinweis auf eine entwicklungsphysiologische Steuerung der Mikrotubuli dar. Die endgültige Abschaltung der Tubulingene würde gleichzeitig das Erreichen des endgültigen Differenzierungsgrades signalisieren. Für den Fall einer späteren Umdifferenzierung oder einer Rückkehr zum meristematischen Zustand, z.B. zur Bildung eines Wundcallus, müßte neben anderen Prozessen auch die Tubulin- Synthese wieder aufgenommen werden, eine Bedingung, die in manchen Zelltypen u.U. nicht erfüllbar ist. Solche Zelltypen wären dann nicht nur

unfähig, Wundcallus zu bilden, sondern auch, sich in Kultur Teilungen zu unterziehen. Eine solche Situation mag in Gräsern vorliegen, deren weit verbreitete Unfähigkeit zur Callusbildung und Pflanzenregeneration aus differenzierten Geweben schon wiederholt zu Zweifeln an der Totipotenz dieser Zellen geführt hat (Vasil, 1982).

ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION

Gegenstand dieser Arbeit war es, Probleme, die bei der Regeneration von Protoplasten auftreten, mit zellbiologischen Methoden zu untersuchen.

Anfängliche Experimente, z.B. diejenigen zum Einfluß eines starken Magnetfeldes, zeigten sehr bald, daß von den beiden kritischen Regenerationsschritten, nämlich (i) der Induktion der Teilung eines isolierten Protoplasten und (ii) der Induktion der Morphogenese eines etablierten Callus, das letztere Problem ungleich komplexer ist. Ein Callus ist ein heterogenes Gemisch verschiedener Zelltypen. Die Induktion der Morphogenese betrifft aber immer nur einige wenige Zellen dieses Gemisches (Thorpe, 1980; Vasil, 1982), die sich zudem nicht synchron entwickeln. Daher ist dem Problem der Callus- Morphogenese mit zellbiologischen Untersuchungen allein kaum näher zu kommen.

Zum Problem der Teilungsinduktion wurden dagegen einige wichtige Befunde mit zellbiologischen Methoden erhalten. Diese Befunde beziehen sich alle direkt oder indirekt auf Bestandteile des Cytoskeletts.

Es wurde der Prozess der Zellwandbildung mit Hilfe einer neu entwickelten ab initio Vitalfärbung verfolgt. Hierbei zeigte sich, daß die Zellwandsynthese über zwei Prozesse verläuft, deren einer Fibrillen erzeugt, während der andere voluminöseres Material produziert. Die Zellwandablagerung geschieht nicht gleichmäßig auf der gesamten Oberfläche, sondern an diskreten Stellen (Hahne et al., 1983). Hierbei können Fehlentwicklungen auftreten, bei denen das synthetisierte Material in das Medium ausgeschieden wird. Dies wird offensichtlich durch Fehlsteuerungen verursacht, an deren

Entstehen höchstwahrscheinlich cytoskelettale Komponenten beteiligt sind.

Es wurde weiterhin die Morphologie von Protoplasten und ihre Bedeutung für die Teilungsinduktion untersucht. Insbesondere wurden mittels Laser- Mikrochirurgie die Cytoplasmastränge reversibel zerstört, was zu einem Zusammenbruch der Plasmaströmung führte. Vor einer Regeneration mußte in allen Fällen die innere Struktur repariert und die Strömung wiederaufgenommen werden. Hierbei wurden Mikrofilamente als wahrscheinliche Grundlage der beobachteten Phänomene identifiziert (Hahne und Hoffmann, 1984a). In diesem Zusammenhang konnte auch nachgewiesen werden, daß pflanzliche Zellen ihre Form aktiv beeinflussen und nicht ausschließlich auf die Begrenzung durch die Zellwand angewiesen sind.

Schließlich wurde zum ersten Mal die Teilungshemmung in einem Modellsystem auf molekulare Grundlagen zurückgeführt und behoben. Hierzu wurden fehlende cortikale Mikrotubuli als Hauptursache für die Teilungsunfähigkeit identifiziert (Hahne und Hoffmann, 1984b). In Verbindung damit ergaben sich einige generellere Informationen über die Bedeutung cortikaler Mikrotubuli bei Differenzierungs- und Dedifferenzierungsvorgängen.

Bei sich nicht teilenden Protoplasten werden unabhängig von Herkunft und Zelltyp immer wieder ähnliche Beobachtungen gemacht (Hoffmann et al., 1984):

(i) Bildung von Riesenzellen: lebende Protoplasten können ohne Anzeichen von Zellwandbildung bis zum 65- fachen Volumen anschwellen (Hoffmann, 1981).

(ii) Störung in der Zellwandbildung: Zellwandmaterial wird bei vielen Zellen nicht oder nur unregelmäßig auf der Oberfläche abgelagert.

(iii) Verschwinden der Cytoplasmastränge: Nach längerer Kulturdauer kann die Organisation des Cytoplasmas in Stränge zusammenbrechen; die Vakuole zerteilt sich in mehrere kleine Vakuolen.

(iv) Endomitosen: Sich nicht teilende Protoplasten können sehr hohe Ploidiegrade erreichen. So wurden z.B. in einer Kultur von Crepis capillaris (2n=2x=6) Zellen mit bis zu 156 Chromosomen gefunden (2n=52x, wahrscheinlich aneuploid).

An all diesen Fehlentwicklungen sind wahrscheinlich eine oder sogar mehrere Komponenten des Cytoskeletts beteiligt, deren nicht ordnungsgemäßes Funktionieren zu den beobachteten Störungen führt.

In der vorliegenden Arbeit sind drei wesentliche Bestandteile des pflanzlichen Cytoskeletts untersucht worden, nämlich Mikrotubuli, Mikrofilamente und Mikrofibrillen (wobei die letzteren freilich nur im weiteren Sinne zum Cytoskelett gehören). Jede einzelne dieser Komponenten ist u.a. an einem wichtigen Prozess beteiligt, ohne dessen einwandfreies Funktionieren keine Regeneration möglich ist. Alle drei Elemente scheinen durch Schritte bei der Isolierung der Protoplasten beschädigt werden zu können. Diese Beschädigung ist je nach Gewebetyp und Spezies des Donormaterials unterschiedlich schwerwiegend. Ist die Natur der Schädigung einmal erkannt, kann ihr Auftreten eventuell verhindert werden, oder aber ihre Auswirkungen können behoben werden. Ein Beispiel hierfür ist die DMSO- induzierte Teilung in Hibiskus-Protoplasten.

Einer der wichtigsten Faktoren für die Regenerierbarkeit von Protoplasten scheint deren Reaktion auf die Isolierungsprozedur zu sein. Die Empfindlichkeit der Zellen kann durch den Genotyp, ihre spezifische Gewebezugehörigkeit, ihre Vorgeschichte (z.B. Anzuchtbedingungen der Pflanze oder des Gewebes) und

wahrscheinlich eine Reihe weiterer Faktoren bedingt sein. Ähnliche Beobachtungen wurden, wenn auch nicht auf molekularer Ebene, an Kulturen verschiedener Gramineen- Gewebe gemacht (z.B. Lu et al, 1981; Vasil, 1982). Hier führen nur solche Kulturen zur Embryogenese, die von ganz bestimmten Geweben in eng begrenzten Entwicklungsstadien initiiert wurden.

Der mit dieser Arbeit eingeschlagene Weg, nämlich die analytische Erforschung der Ursachen, die der Teilungsunfähigkeit zugrunde liegen, war bereits recht erfolgreich und verdient es sicherlich, weiter verfolgt zu werden. Die empirische Optimierung der Kulturbedingungen ist in der Anfangsphase eines neuen Forschungszweiges sicher weiterhin sehr wichtig. Doch scheint der empirische Ansatz eine Reihe dringend anstehender Probleme nicht lösen zu können. Als Beispiel sei die "Widerspenstigkeit" der Getreideprotoplasten genannt, die sich bisher trotz eines großen Forschungsaufwandes sehr erfolgreich der Regeneration widersetzt haben. Versuche mit einer enormen Zahl von Medienkompositionen (über 40000, s. z.B. Potrykus et al., 1976) brachten keinen entsprechenden Fortschritt. Es dürfte auch hier sehr lohnend sein, den molekularen Grundlagen der Probleme nachzugehen.

Diese Arbeit wirft natürlich auch zahlreiche neue Fragen auf. (i) Wie universell ist z.B. die Teilungshemmung durch Verlust oder Nichtsynthese von Mikrotubuli? Hierzu müßten mehr Spezies immunfluoreszenzmikroskopisch untersucht werden, insbesondere auch Monokotyledonae. (ii) Ist tatsächlich eine Phytoalexin-induzierende Reaktion an den beobachteten Vorgängen beteiligt? Hier wäre eine detailierte phytochemische Untersuchung angebracht. (iii) Sind die Schockreaktionen, die nach Laser- Beschuß beobachtet wurden, auch nach anderen Schocks in ähnlicher Form zu beobachten? Insbesondere, welche Art von Schock stellen die

verschiedenen Fusionsmethoden dar? Wie reagieren teilungsunfähige Zellen nach der Fusion mit teilungsfähigen Zellen? Wie arrangiert sich das Cytoskelett nach einer Fusion?

LITERATUR

Albersheim P, Darvill AC, Sharp JK, Davis KR, Nothnagel EA, Fry SC, Valent BS, McNeil M 1983 On the role of biologically active carbohydrates in plant-microbe interaction. J Cell Biochem Suppl 7B:252

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD 1983 Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing Inc, New York

Allen NS, Allen RD 1978a Cytoplasmic streaming in green plants. Annu Rev Biophys Bioeng 7:497-526

Allen RD, Allen NS 1978b Cytoplasmic streaming in amoeboid movement. Annu Rev Biophys Bioeng 7:469-495

Anonymus 1974 Success of breeding the new tobacco cultivar "Tan-yuk No.1". Acta Bot Sin 16:300-303

Anonymus 1976 New rice varieties "Hua Yü I" and "Hua Yü II" developed from anther culture. Acta Genet Sin 3:19-24

Audus LJ 1960 Magnetotropism: A new plant growth response. Nature 185:132-134

Audus LJ, Whish JC 1964 Magnetotropism. In: Biological Effects of Magnetic Fields, pp 170-182. Barnothy MF (ed), Plenum Press, New York

Barak LS, Yocum RR, Nothnagel EA, Webb WW 1980 Fluorescence staining of the actin cytoskeleton in living cells with 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole-phallacidin. Proc Natl Acad Sci USA 77:980-984

Barnett RE 1978 The effects of dimethylsulfoxide and glycerol on Na^+, K^+-ATPase and membrane structure. Cryobiology 15:227-229

Bennett V 1978 Purification of an active proteolytic fragment of the membrane attachment site for human erythrocyte spectrin. J Biol Chem 253:2292-2299

Benziman M, Haigler CH, Brown RMjr, White AR, Cooper KM 1980 Cellulose biogenesis: polymerization and crystallization are coupled processes in Acetobacter xylinum. Proc Natl Acad Sci USA 77:6678-6682

Berns MW, Aist J, Edwards J, Strahs K, Girton J, McNeill P, Rattner JB, Kitzes M, Hammer-Wilson M, Liaw L-H, Siemens A, Koonce M, Peterson S, Brenner S, Burt J, Walter R, Bryant PJ, van Dyk D, Coulombe J, Cahill T, Berns GS 1981 Laser Microsurgery in cell and developmental biology. Science 213:505-513

Birchmeier W 1984 Cytoskeleton structure and function. Trends Biochem Sci 9:192-195

Bradley MO 1973 Microfilaments and cytoplasmic streaming: inhibition of streaming with cytochalasin. J Cell Sci 12:327-343

Branton D, Cohen CM, Tyler J 1981 Interaction of cytoskeletal proteins on the human erythrocyte membrane. Cell 24:24-32

Burgess J, Linstead PJ 1982 Cell-wall differentiation during growth of electrically polarized protoplasts of Physcomitrella. Planta 156:241-248

Burk LG, Matzinger DF 1976 Variation among anther-derived doubled haploids from an inbred line of tobacco. J Hered 67:381-384

Burridge K, Kelly T, Mangeat P 1982 Nonerythrocyte spectrins: actin-membrane attachment proteins occurring in many cell types. J Cell Biol 95:478-486

Cleveland DW 1983 The tubulins: from DNA to RNA to protein and back again. Cell 34:330-332

Cocking EC 1960 A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. Nature 187:962-963

Constabel F 1984 Fusion of protoplasts by polyethylene glykol (PEG). In: Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol 1, pp 414-422. Vasil IK (ed), Academic Press, London

Cook ES, Smith SMJ 1964 Increase of trypsin activity. In: Biological Effects of Magnetic Fields, pp 246-254. Barnothy MF (ed), Plenum Press, New York

Cotter DA, Morin JW, O'Connell RW 1976 Spore germination in Dictyostelium discoideum II - effects of dimethyl sulfoxide on post-activation lag as evidence for the multistate model of action. Arch Microbiol 108:93-98

Crossin KL, Carney DH 1981 Microtubule stabilization by taxol inhibits initiation of DNA synthesis by thrombin and by epidermal growth factor. Cell 27:341-350

Dale PJ 1983 Protoplast culture and plant regeneration of cereals and other recalcitrant crops. Experientia Suppl 46:31-41

Darken MA 1961 Applications of fluorescent brighteners in biological techniques. Science 133:1704-1705

Darvill AG, Albersheim P 1984 Phytoalexins and their elicitors - a defense against microbial infection in plants. Annu Rev Plant Physiol 35:243-275

De Mey J, Laubert AM, Bajer AS, Moeremans M, De Brabander M 1982 Visualization of microtubules in interphase and mitotic plant cells of Haemanthus endosperm with the immuno-gold staining method. Proc Natl Acad Sci USA 79:1898-1902

Dustin P 1978 Microtubules, Springer Verlag, Berlin

Erdei L, Vigh L, Dudits D 1982 Isolation of a wheat cell line with altered membrane properties. Plant Physiol 69:572-574

Evans DA, Bravo JE 1983 Protoplast isolation and culture. In: Handbook of Plant Cell Culture Vol I, pp 124-176. Evans DA, Sharp WR, Ammirato PV, Yamada Y (eds), Macmillan Publ Co, New York

Fishman MC, Dragsten PR, Spector I 1981 Immobilization of concanavalin A receptors during differentiation of neuroblastoma cells. Nature 290:781-783

Flavell RB 1982 Recognition and modification of crop plant genotypes using techniques of molecular biology. In: Plant Improvement and Somatic Cell Genetics, pp 277-291. Vasil IK, Scowcroft WR, Frey KJ (eds), Acad Press, London

Fowke LC 1975 Electron microscopy of protoplasts. In: Plant Tissue Culture Methods, pp 55-59. Gamborg OL, Wetter LR (eds), National Research Council of Canada, Saskatoon

Fowke LC, Gamborg OL 1980 Applications of protoplasts to the study of plant cells. Int Rev Cytol 68:9-51

Fowke LC, Bech-Hansen CW, Gamborg OL, Shyluk JP 1973 Electron microscopic observation of cultured cells and protoplasts of Ammi visnaga. Am J Bot 60:304-312

Fowke LC, Bech-Hansen CW, Constabel F, Gamborg OL 1974a A comparative study on the ultrastructure of cultured cells and protoplasts of soybean during cell division. Protoplasma 81:189-203

Fowke LC, Bech-Hansen CW, Gamborg OL 1974 b Electron microscopic observations of cell regeneration from cultured protoplasts of Ammi visnaga. Protoplasma 79:235-248

Friend C, Scher W, Holland JG, Toru Sato 1971 Hemoglobin synthesis in murine virus-induced leukemic cells in vitro: stimulation of erythroid differentiation by dimethyl sulfoxide. Proc Natl Acad Sci USA 68:378-382

Fukui Y 1980 Formation of multinuclear cells induced by dimethyl sulfoxide: inhibition of cytokinesis and occurrence of novel nuclear division in Dictyostelium cells. J Cell Biol 86:181-189

Fuller GM, Brinkley BR, Boughter JM 1975 Immunofluorescence of mitotic spindles by using monospecific antibody against bovine brain tubulin. Science 187:948-950

Galbraith DW, Galbraith JEC 1979 A method for identification of fusion of plant protoplasts derived from tissue cultures. Z Pflanzenphysiol 93:149-158

Galun E 1981 Plant protoplasts as physiological tools. Annu Rev Plant Physiol 32:237-268

Gamborg OL, Miller RA, Ojima K 1968 Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp Cell Res 50:148-151

Gigot C, Schmitt C, Hirth L 1972 Modifications ultrastructurales observees au cours de la preparation de protoplastes a partir de cultures de tissus de tabac (Nicotiana glutinosa L.). J Ultrastruct Res 41:418-432

Gigot C, Kopp M, Schmitt C, Milne RG 1975 Subcellular changes during isolation and culture of tobacco mesophyll protoplasts. Protoplasma 84:31-41

Grebecka L, Kalinina LV 1979 Effects of DMSO on the motory behaviour of Amoeba proteus. Acta Protozool 18:327-332

Gunning BES, Hardham AR 1982 Microtubules. Annu Rev Plant Physiol 33:651-698

Hahne G, Herth W, Hoffmann F 1983 Wall formation and cell division in fluorescence-labelled plant protoplasts. Protoplasma 115: 217-221

Hahne G, Hoffmann F 1984a The effect of laser microsurgery on cytoplasmic strands and cytoplasmic streaming in isolated plant protoplasts. Eur J Cell Biol 33:175-179

Hahne G, Hoffmann F 1984 b Dimethyl sulfoxide can initiate division of arrested callus protoplasts by promoting microtubule assembly. Proc Natl Acad Sci USA 81:5449-5453

Haigis E, Gitzelmann R, Ott H 1981 Cell transformation of frozen human fibroblasts by a strong magnetic field? - a reinvestigation. Experientia 37:255

Hamel E, delCampo AA, Lowe MC, Lin CM 1981 Interactions of taxol, microtubule-associated proteins, and guanine nucleotides in tubulin polymerization. J Biol Chem 256:11887-11894

Hanke DE, Northcote DH 1974 Cell wall formation by soybean callus protoplasts. J Cell Sci 14, 29-50

Hanstein J 1880 Einige Züge aus der Biologie des Protoplasmas. Bot Abh 4:1-56

Hardham AR, Gunning BES 1980 Some effects of colchicine on microtubules and cell division in roots of Azolla pinnata. Protoplasma 102:31-51

Harel L, Blat C, Lacour F, Friend C 1981 Altered RNA/protein ratio associated with the induction of differentiation of Friend erythroleukemia cells. Proc Natl Acad Sci USA 78:3882-3886

Hayama T, Shimmen T, Tazawa M 1979 Participation of Ca^{2+} in cessation of cytoplasmic streaming induced by membrane excitation in Characean internodal cells. Protoplasma 99:305-321

Haydu Y, Lazar G, Dudits D 1977 Increased frequency of polyethylene glycol induced protoplast fusion by dimethylsulfoxide. Plant Sci Lett 10:357-360

Heath IB 1974 A unified hypothesis for the role of membrane bound enzyme complexes and microtubules in plant cell wall synthesis. J Theor Biol 48:445-449

Heath IB, Seagull RW 1982 Orientated cellulose fibrils and the cytoskeleton: a critical comparison of models. In: The Cytoskeleton in Plant Growth and Development, 163-182. Lloyd CW, Academic Press, London

Hensel W 1984 Microtubules in statocytes from roots of cress (Lepidium sativum L.). Protoplasma 119:121-134

Hepler PK, Palevitz BA 1974 Micotubules and microfilaments. Annu Rev Plant Physiol 25:309-362

Herth W 1980 Calcofluor white and congo red inhibit chitin microfibril assembly of Poterioochromonas: evidence for a gap between polymerization and microfibril formation. J Cell Biol 87:442-450

Herth W, Meyer Y 1977 Ultrastructural and chemical analysis of the wall fibrils synthesized by tobacco mesophyll protoplasts. Biol Cell 30:33-40

Herth W, Schnepf E 1980 The fluorochrome, calcofluor white, binds oriented to structural polysaccharide fibrils. Protoplasma 105:129-133

Himes RH, Burton PR, Gaito JM 1977 Dimethyl sulfoxide-induced self-assembly of tubulin lacking associated proteins. J Biol Chem 252:6222-6228

Hoffmann F 1981 Formation of cytoplasts from giant protoplasts in culture. Protoplasma 107:387-391

Hoffmann F, Thomas E, Wenzel G 1982 Anther culture as a breeding tool in rape II - progeny analysis of androgenetic lines and induced mutants from haploid cultures. Theor Appl Genet 61: 225-232

Hoffmann F, Hahne B, Hahne G 1984 Are cortical microtubules essential for cell wall formation and cell division by isolated callus protoplasts? In: Structure, Function, and Biosynthesis of Plant Cell Walls, pp 444-448. Dugger DM, Bartnicki-Garcia S, (eds), American Society of Plant Physiologists Press, Rockville

Hyams JS 1982 Microtubules. In: The Cytoskeleton in Plant Growth and Development, pp 31-53. Lloyd CW, (ed), Academic Press, London

Jackson WT 1982 Actomyosin. In: The Cytoskeleton in Plant Growth and Development, pp 3-29. Lloyd CW (ed), Academic Press, London

Kaiser R 1980 (Hrsg) Global 2000. Verlag Zweitausendeins, Frankfurt

Kamitsubo E 1972 A 'window technique' for detailed observation of Characean cytoplasmic streaming. Exp Cell Res 74:613-616

Kamiya N 1981 Physical and chemical basis of cytoplasmic streaming. Annu Rev Plant Physiol 32:205-236

Kao KN, Michayluk MR 1974 A method for high-frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. Planta 115:355-367

King PJ, Potrykus I, Thomas E 1978 In vitro genetics of cereals: problems and perspectives. Physiol Veg 16:381-399

Kishimoto U, Akabori H 1959 Protoplasmic streaming of an internodal cell of Nitella flexilis and its correlation with electric stimuli. J Gen Physiol 42:1167-1183

Klercker J 1892 Eine Methode zur Isolierung lebender Protoplasten. Öfversigt af Kongl Vetenskaps- Akademiens Förhandlingar, Stockholm 49:463-474

Kluge N, Ostertag W, Sugiyama T, Arndt-Jovin D, Steinheider G, Furusawa M, Dube SK 1976 Dimethylsulfoxide-induced differentiation and hemoglobin synthesis in tissue cultures of rat erythroleukemia cells transformed by 7,12-dimethylbenz(alpha)anthracene. Proc Natl Acad Sci USA 73:1237-1240

Kohlenbach HW 1978 Comparative somatic embryogenesis. In: Frontiers of Plant Tissue Culture, pp 59-66. Thorpe TA (ed), University of Calgary Press, Calgary

Küster E 1935 Die Pflanzenzelle. Gustav Fischer Verlag, Jena

Kumar N 1981 Taxol-induced polymerization of purified tubulin. J Biol Chem 256:10435-10441

Larocca D, Homisak D, Clough W 1981 Synthesis of hypomethylated Epstein-Barr viral DNA is stimulated by dimethylsulfoxide treatment of lymphoblastoid cells. Biochem Biophys Res Comm 100:559-565

Lee JC, Timasheff SN 1977 In vitro reconstitution of calf brain microtubules: effects of solution variables. Biochemistry (Engl Transl) 16:1754-1764

Leslie RJ, Pickett-Heaps JD 1983 Ultraviolett microbeam irradiations of mitotic diatoms: investigation of spindle elongation. J Cell Biol 96:548-561

Liaw L-HL, Berns MW 1981 Electron microscope autoradiography on serial sections of preselected single living cells. J Ultrastruct Res 75:187-194

Lloyd CW 1983 Helical microtubular arrays in onion root hairs. Nature 305:311-313

Lloyd CW, Slabas AR, Powell AJ, MacDonald G, Badley RA 1979 Cytoplasmic microtubules of higher plant cells visualized with anti-tubulin antibodies. Nature 279:239-241

Lloyd CW, Slabas AR, Powell AJ, MacDonald G, Lowe SB, Peace G 1979 b Microtubules in higher plant cells and protoplasts. In: Advances in Protoplast Research, pp 469-474. Ferenczy L, Farkas GL (eds), Pergamon Press, Oxford

Lloyd CW, Slabas AR, Powell AJ, Lowe SB 1980 Microtubules, protoplasts and plant cell shape. An immunofluorescent study. Planta 147:500-506

Lu C, Vasil V, Vasil IK 1981 Isolation and culture of protoplasts of Panicum maximum Jaqc. (guinea grass): somatic embryogenesis and plantlet formation. Z Pflanzenphysiol 104:311-318

Lyman GH, Papahadjopoulos D, Preisler HD 1976 Phospholipid membrane stabilization by dimethylsufoxide and other inducers of Friend leukemic cell differentiation. Biochim Biophys Acta 448:460-473

Lyu BN 1980 Effect of permanent magnetic field on oxygen-substrate interaction and the possible mechanism of some biomagnetic effects. Izv Akad Nauk SSSR Ser Biol 3:415-424

Mager D, Bernstein A 1978 Early transport changes during erythroid differentiation of Friend leukemic cells. J Cell Physiol 94: 275-286

Malinin GI, Gregory WD, Morelli L, Sharma VK, Houck JC 1976 Evidence of morphological and physiological transformation of mammalian cells by strong magnetic fields. Science 194:844-846

Markov MS 1981 Biological mechanisms of the magnetic field action. IEEE Trans Magn MAG-17:2334-2337

Mazia D, Sale WS, Schatten, G 1974 Polylysine as an adhesive for electron microscopy. J Cell Biol 63:212a

Meadows DH, Meadows DL, Randers J, Behrens WWIII 1974 The limits to growth - a report for the Club of Rome's project on the predicament of mankind. Universe Books, New York

Melchers G 1977 Kombination somatischer und konventioneller Genetik für die Pflanzenzüchtung. Naturwissenschaften 64:184-194

Mendiburu AO, Peloquin SJ, Mok D 1974 Potato breeding with haploids and 2n gametes. Proc Haploids in Higher Plants - Advances and Potential, pp 249-258. Kasha KJ (ed), University of Guelph

Meyer Y, Abel WO 1975 Importance of the wall for cell division and in the activity of the cytoplasm in cultured tobacco protoplasts. Planta 123:33-40

Meyer Y, Herth W 1978 Chemical inhibition of cell wall formation and cytokinesis, but not of nuclear division, in protoplasts of Nicotiana tabacum L. cultivated in vitro. Planta 142:253-262

Montezinos D 1982 The role of the plasma membrane in cellulose microfibril assembly. In: The Cytoskeleton in Plant Growth and Development, pp 147-162. Lloyd CW (ed), Academic Press, London

Morejohn LC, Fosket DE 1982 Higher plant tubulin identified by self-assembly into microtubules in vitro. Nature 297:426-428

Morejohn LC, Bureau TA, Tocci L, Fosket DE 1984 Tubulins from different higher plant species are immunologically nonidentical and bind colchicine differentially. Proc Natl Acad Sci USA 81: 1440-1444

Müller AJ, Grafe R 1978 Isolation and characterization of cell lines of Nicotiana tabacum lacking nitrate reductase. Mol Gen Genet 161:67-76

Murashige T, Skoog F 1962 A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15:473-497

Nagai R, Kamiya N 1977 Differential treatment of Chara cells with cytochalasin B with special reference to its effect on cytoplasmic streaming. Exp Cell Res 108:231-237

Nagata T, Takebe I 1971 Plating of isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium. Planta 99:12-20

Nakamura A, Yamada T, Kadotani N, Itagaki R 1974 Improvement of flue-cured tobacco variety MC 1610 by means of haploid breeding method and investigations on some problems of this method. Proc Haploids in Higher Plants - Advances and Potential, pp 277-278. Kasha KJ (ed), University of Guelph

Nazarova NM, Livshits VA, Anzin VB, Veselago VG, Kuznetsov AN 1982 Hydrolysis of globular proteins with trypsin in a strong magnetic field. Biofizika 27:720-721

Nothnagel EA, Barak LS, Sanger JW, Webb WW 1981 Fluorescence studies on modes of cytochalasin B and phallotoxin action on cytoplasmic streaming in Chara. J Cell Biol 88:364-372

Nothnagel EA, McNeil M, Albersheim P, Dell A 1983 Host- pathogen interactions XXII - a galacturonic acid oligosaccharide from plant cell walls elicits phytoalexins. Plant Physiol 71:916-926

Otten L, De Greve H, Hernalsteens JP, Van Montagu M, Schieder O, Straub J, Schell J 1981 Mendelian transmission of genes introduced into plants by the Ti plasmids of Agrobacterium tumefaciens. Mol Gen Genet 183:209-213

Palevitz BA 1976 Actin cables and cytoplasmic streaming in green plants. In: Cell Motility, pp 601-611. Goldman R, Pollard T, Rosenbaum J (eds), Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York

Palevitz BA 1980 Comparative effects of phalloidin and cytochalasin B on motility and morphogenesis in Allium. Can J Bot 58:773-785

Papp E, Meszena G 1982 Field concentration and temperature dependence of fluorescence polarization of magnetically oriented chloroplasts. Biophys J 39:1-5

Potrykus I 1979 The old problem of protoplast culture: cereals. In: Advances in Protoplast Research, pp 243-254. Ferenczy L, Farkas GL (eds), Pergamon Press, Oxford

Potrykus I, Harms CT, Lörz H 1976 Problems in culturing cereal protoplasts. In: Cell Genetics in Higher Plants, pp 129-140. Dudits D, Farkas GL, Maliga P (eds), Akademiai Kiado, Budapest

Powell AJ, Lloyd CW, Slabas AR, Cove DJ 1980 Demonstration of the microtubular cytoskeleton of the moss, Physcomitrella patens, using antibodies against mammalian brain tubulin. Plant Sci Lett 18:401-404

Pressman BC, Fahim M 1982 Pharmacology and toxicology of the monovalent carboxylic ionophores. Annu Rev Pharmacol Toxicol 22:465-490

Rebhun LI 1972 Polarized intracellular particle transport: saltatory movements and cytoplasmic streaming. Int Rev Cytol 32:93-137

Reinert J 1959 Über die Kontrolle der Morphogenese und die Induktion von Adventivembryonen an Gewebekulturen aus Karotten. Planta 53:318-333

Robinson DG, Quader H 1982 The microtubule-microfibril syndrome. In: The Cytoskeleton in Plant Growth and Development, pp 109-126. Lloyd CW (ed), Acad Press, London

Robinson J, Engelborghs Y 1982 Tubulin polymerization in dimethylsulfoxide. J Biol Chem 257:5367-5371

Sacristan MD, Melchers G 1969 The kariological analysis of plants regenerated from tumorous and other callus cultures of tobacco. Mol Gen Genet 105:317-333

Schell J, Van Montagu M, Holsters M, Depicker A, Zambryski P, Dhaese P, Hernalsteens J-P, Leemans J, De Greve H, Willmitzer L, Otten L, Schroeder J, Schroeder G 1982 Plant cell transformations and genetic engineering. In: Plant Improvement and Somatic Cell Genetics, pp 255-276. Vasil IK, Scowcroft WR, Frey KJ (eds), Acad Press, London

Schilde-Rentschler L 1977 Role of the cell wall in the ability of tobacco protoplasts to form callus. Planta 135:177-181

Schmit AC, Vantard M, deMey J, Lambert A-M 1983 Aster-like microtubule centers establish spindle polarity during interphase-mitosis transition in higher plant cells. Plant Cell Rep 2:285-288

Schnepf E, Deichgräber G, Ljubesic N 1976 The effects of colchicine, ethionine, and deuterium oxide on microtubules in young Sphagnum leaflets. A quantitative study. Cytobiol 13:341-353

Schnepf E, Deichgräber G, Herth W 1982 Development of cell wall appendages in Acanthosphaera zachariasi (Chlorococcales): kinetics, site of cellulose synthesis and of microfibril assembly, and barb formation. Protoplasma 110:203-214

Scowcroft WR, Larkin PJ 1982 Somaclonal variation: a new option for plant improvement. In: Plant Improvement and Somatic Cell Genetics, pp 159-178. Vasil IK, Scowcroft WR, Frey KJ (eds), Academic Press, London

Sharp WR, Söndahl MR, Caldas LS, Maraffa LS 1980 The physiology of in vitro asexual embryogenesis. Hortic Rev 2:268-310

Shimmen T, Tazawa M 1982 Cytoplasmic streaming in the cell model of Nitella. Protoplasma 112:101-106

Siemens A, Walter R, Liaw L-H, Berns, MW 1982 Laser-stimulated fluorescence of submicrometer regions within single mitochondria of rhodamine-treated myocardial cells in culture. Proc Natl Acad Sci USA 79:466-470

Simmonds D, Setterfield G, Brown DL 1983 Organization of microtubules in dividing and elongating cells of Vicia hajastana Grossh. in suspension culture. Eur J Cell Biol 32:59-66

Sonneveld A, Duysens LNM, Moerdijk A 1981 Sub-microsecond chlorophyll a delayed fluorescence from photosystem I magnetic field-induced increase of the emission yield. Biochim Biophys Acta 636:39-49

Sperber D, Dransfeld K, Maret G, Weisenseel MH 1981 Oriented growth of pollen tubes in strong magnetic fields. Naturwissenschaften 68:40

Steinbiss H-H, Stabel P 1983 Protoplast derived tobacco cells can survive capillary microinjection of the fluorescent dye lucifer yellow. Protoplasma 116:223-227

Takebe I, Otsuki Y, Aoki S 1968 Isolation of tobacco mesophyll cells in intact and active state. Plant Cell Physiol 9:115-124

Takebe I, Labib G, Melchers G 1971 Regeneration of whole plants from isolated mesophyll protoplasts of tobacco. Naturwissenschaften 58: 318-320

Takebe I, Otsuki Y, Honda Y, Nishio T, Matsui C 1973 Fine structure of isolated mesophyll protoplasts of tobacco. Planta 113:21-27

Taylor ARD, Hall JL 1978 Fine structure and cytochemical properties of tobacco leaf protoplasts and comparison with the source tissue. Protoplasma 96:113-126

Taylor ARD, Hall JL 1979 An ultrastructural comparison of lanthanum and silicotungstic acid/chromic acid as plasma membrane stains of isolated protoplasts. Plant Sci Lett 14:139-144

Thomas E, King PJ, Potrykus I 1979 Improvement of crop plants via single cells in vitro - an assessment. Z Pflanzenzüchtg 82: 1-30

Thomas MR, Rose RJ 1983 Plastid number and plastid structural changes associated with tobacco mesophyll protoplast culture and plant regeneration. Planta 158:329-338

Thorpe TA 1980 Organogenesis in vitro: structural, physiological, and biochemical aspects. Int Rev Cytol Suppl 11A:71-111

Towill LE 1981 Survival at low temperatures of shoot tips from cultivars of Solanum tuberosum group tuberosum. Cryo Lett 2:373-382

Uretz RB, Bloom W, Zirkle E 1954 Irradiation of parts of individual cells. II - effects of an ultraviolett microbeam focussed on parts of chromosomes. Science 120:197-199

Vahey M, Titus M, Trautwein R, Scordilis S 1982 Tomato actin and myosin: contractile proteins from a higher land plant. Cell Motility 2:131-147

Van der Valk P, Rennie PJ, Connolly JA, Fowke LC 1980 Distribution of cortical microtubules in tobacco protoplasts: an immunofluorescent microscopic and ultrastructural study. Protoplasma 105:27-43

Vasil IK 1982 Plant cell culture and somatic cell genetics of cereals and grasses. In: Plant Improvement and Somatic Cell Genetics, pp 179-203. Vasil IK, Scowcroft WR, Frey KJ (eds), Academic Press, London

Vasil IK 1983 Regeneration of plants from single cells of cereals and grasses. In: Genetic Engineering in Eukaryotes, pp 233-252. Lurquin P, Kleinhofs A (eds), Plenum Press, New York

Vasil IK, Vasil V 1979 Embryogenesis and plantlet formation from protoplasts of pearl millet (Pennisetum americanum). In: Advances in Protoplast Research, pp 255-259. Ferenczy L, Farkas GL (eds), Pergamon Press, Oxford

Vasil IK, Ahuja MR, Vasil V 1979 Plant tissue cultures in genetics and plant breeding. Adv Genet 20:127-215

Vasil V, Vasil IK 1980 Isolation and culture of cereal protoplasts. II embryogenesis and plantlet formation from protoplasts of Pennisetum americanum. Theor Appl Genet 56:97-99

Wallin A, Eriksson T 1973 Protoplast cultures from cell suspensions of Daucus carota. Physiol Plant 28:33-39

Wallin A, Glimelius K, Eriksson T 1974 The induction of aggregation and fusion of Daucus carota protoplasts by polyethylene glycol. Z Pflanzenphysiol 74:64-80

Weber K 1975 Specific visualization of tubulin containing structures by immunofluorescence microscopy: cytoplasmic microtubules, vinblastine induced paracrystals and mitotic figures. In: Microtubules and Microtubule Inhibitors. Borgers M, de Brabander M, (eds), North Holland Publishing Co, Amsterdam

Wick SM, Duniec J 1983 Immunofluorescence microscopy of tubulin and microtubule arrays in plant cells. I - preprophase band development and concomitant appearance of nuclear envelope-associated tubulin. J Cell Biol 97:235-243

Wick SM, Seagull RW, Osborn M, Weber K, Gunning BES 1981 Immunofluorescence microscopy of organized microtubule arrays in structurally stabilized meristematic plant cells. J Cell Biol 89:685-690

Williamson FA, Fowke LC, Weber G, Constabel F, Gamborg O 1977 Microfibril deposition on cultured protoplasts of Vicia hajastana. Protoplasma 91:213-219

Williamson RE 1972 A light-microscope study of the action of cytochalasin B on the cells and isolated cytoplasm of the Characeae. J Cell Sci 10:811-819

Willison JHM, Grout BWW 1978 Further observations on cell-wall formation around isolated protoplasts of tobacco and tomato. Planta 140:53-58

Wolfe J, Steponkus PL 1983 Mechanical properties of the plasma membrane of isolated plant protoplasts. Plant Physiol 71:276-285

Wolosewick JJ, Porter KR 1977 Effect of low temperature on the ground substance of cultured cells. J Cell Biol 75:275a

Yin KC, Hsu C, Chu CY, Bi Y, Wang ST, Liu TY, Chu CC, Wang CC, Sun CS 1976 A study of the new cultivar of rice raised byhaploid breeding method. Sci Sin 19:227-242

Zachrisson A, Bornmann CH 1984 Application of electric field fusion in plant tissue culture. Physiol Plant 61:314-320

Zimmermann U 1982 Electric-field mediated fusion and related electrical phenomena. Biochim Biophys Acta 694:227-277

Zimmermann U, Scheurich P 1981 High frequency fusion of plant protoplasts by electric fields. Planta 151:26-32

Zimmermann U, Vienken J 1982 Electric field-induced cell-to-cell fusion. J Membrane Biol 67:165-182

ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit zellbiologischen Untersuchungen an isolierten Protoplasten, insbesondere im Hinblick auf die Prozesse, die bei der Kultur und Regeneration dieser zellwandlosen Pflanzenzellen von Bedeutung sind. Hierzu wurden unterschiedliche experimentelle Ansätze verfolgt.

1.) Es wurde die Reaktion isolierter Protoplasten und von Calluskulturen auf ein starkes konstantes Magnetfeld untersucht. Das Magnetfeld übte keinen spezifischen Effekt auf die Lebensfähigkeit, Teilungsrate, Zellwandsynthese und morphogenetische Kapazität aus.

2.) Mittels des optischen Aufhellers Calcofluor White wurde eine Vitalfärbung entwickelt, die es erlaubt, die Zellwandbildung in Kulturen isolierter Protoplasten direkt zu verfolgen. Die Auflösung dieser Methode reicht bis in den Bereich einzelner Mikrofibrillen. Hierbei wurden zwei Ablagerungsformen beobachtet: a) die direkte Bildung von fibrillärem Material, das auf der ganzen Zelloberfläche gleichmäßig verteilt erscheint, und b) die Bildung von zunächst voluminösem, nichtfibrillärem Material, das sich, von einigen wenigen Stellen ausgehend, über die gesamte Oberfläche ausbreitet. Bei beiden Formen handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um Zellulose.

3.) Laser- mikrochirurgische Untersuchungen gaben Aufschluß über Zusammenhänge zwischen Plasmaströmung, äußerer Zellform und innerer Zellstruktur. Es konnte gezeigt werden, daß die Organisation des Cytoplasmas in Strängen mit dem Auftreten von Plasmaströmung zusammenhängt, daß das Cytoplasma einer strömenden Zelle unter Spannung steht und daß auch zellwandlose Pflanzenzellen in der Lage sind, ihre äußere Form aktiv zu beeinflussen. Die im Zusammenhang mit diesen Untersuchungen durchgeführte Rekonstruktion eines Callusprotoplasten aus Seriendünnschnitten zeigte, daß das Innere dieses Protoplasten aus

einer sehr komplizierten Anordnung von Plasmaflächen besteht, die eine einzige zentrale Vakuole stark kompartimentieren.

4.) Schließlich gelang es erstmals, die Teilungsunfähigkeit einer kultivierten Zelle auf molekulare Grundlagen zurückzuführen und experimentell zu beheben. Es zeigte sich, daß ein Netz cortikaler Mikrotubuli eine Voraussetzung für die Induzierbarkeit der Zellteilung ist und daß dieses Netz durch die Protoplastenisolierung geschädigt werden kann. Die Rolle der cortikalen Mikrotubuli wurde sowohl in Callusprotoplasten untersucht, deren cortikales Mikrotubuli- Netz durch die Aufarbeitung geschädigt war, als auch in Callusprotoplasten, in denen die Mikrotubuli durch Hemmstoffbehandlung entfernt waren. Des weiteren wurde nachgewiesen, daß ausdifferenzierte Blattzellen keine cortikalen Mikrotubuli besitzen, diese jedoch in Kultur ausbilden müssen, bevor eine Teilung stattfinden kann. Somit darf eine generelle Bedeutung des Systems cortikaler Mikrotubuli für die Auslösung der Teilung in kultivierten Zellen höherer Pflanzen angenommen werden, auch wenn sie nicht direkt an der Zellteilung beteiligt sind.

Die wesentlichen Ergebnisse dieser Arbeit sind in 4 Originalpublikationen in den Zeitschriften Protoplasma, European Journal of Cell Biology und den Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America publiziert worden. Ein weiteres Manuskript mit dem Titel "Cortical microtubular lattices: Absent from mature plant cells and necessary for cell division" liegt Science zur Begutachtung vor. Außerdem fanden sie in zahlreichen Poster- Präsentationen (z.B. Freiburg, Plymouth, Davis, Olomouc), Kongress- Abstracts (z.B. Peking) und Kongress- Proceedings (z.B. Riverside) Berücksichtigung.

Herrn Prof. Dr. F. Hoffmann gilt mein herzlicher Dank für die Anregung zu dieser Arbeit und ihre Betreuung sowie für seine unerschöpfliche Geduld, mit der er jederzeit bei Fragen und Problemen aller Art Hilfe gewährte.

Frau Prof. Dr. H. Ninnemann danke ich ebenso herzlich für ihre vielen hilfreichen Anregungen und Kommentare sowie für die Betreuung und Förderung dieser Arbeit als Universitätsvertreter.

Herrn Prof. Dr. H.G. Schweiger sei gedankt für die freundliche Aufnahme im Max- Planck- Institut für Zellbiologie in Ladenburg während der Zeit, die dem Erlernen der Zellkulturtechnik gewidmet war.

Dem Max- Planck- Institut für Festkörperforschung in Stuttgart, insbesondere Herrn Prof. Dr. K. Dransfeld sowie Herrn Dr. D. Sperber sei gedankt für ihre Hilfe bei der Benutzung des Starkfeld- Magneten.

Des weiteren danke ich den folgenden Kollegen: Herrn Dr. G. Weber für ungezählte Soja- Suspensionskultur- Zellen, deren Protoplasten ich isoliert habe; Herrn Dr. D. Pepper, der bei der Erarbeitung der Immunfluoreszenztechnik seine Erfahrungen mit mir teilte; Herrn Dr. L.J. Morejohn und Herrn Dr. D.E. Fosket für die Überlassung der Antikörper gegen pflanzliches Tubulin; Frau L.-H.L. Liaw, die mich in die Kunst der Dünnschnitt- Technik einführte und die Ultradünnschnitte für die Elektronenmikroskopie anfertigte; Herrn Dr. M.W. Berns für die Benutzung der Laser- Microbeam- Anlage sowie der elektronischen Bildverarbeitungsanlage; Frau M. Arditti für die künstlerische Interpretation der rekonstruierten Zelle; und Frau H. Hoffmann, die meine Arbeit mit unermüdlichem Kampf gegen die Widrigkeiten bei der Protoplastenisolierung unterstützte.

Schließlich gilt mein Dank dem Deutschen Akademischen Austauschdienst, dessen Sonderprogramm Gentechnologie einen Teil meines Aufenthaltes in den Vereinigten Staaten von Amerika finanzierte.

Lebenslauf

Günther Hahne

geboren:	21. März 1955, in Iserlohn, Nordrhein-Westfalen
Familienstand:	verheiratet, 1 Kind
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Ausbildung

4/61-4/65	Grundschule: Gemeinschaftsschule Rheinkamp-Baerl, Krs. Moers, Nordrhein-Westfalen
4/65-8/68	Gymnasien: Sexta-Untertertia: Franz-Haniel Gymnasium, Homberg/Ndrh., Nordrhein-Westfalen
8/68-5/73	Untertertia-Abitur: Theodor-Heuss Schule, Ratingen Nordrhein-Westfalen
5/73	Abitur an der Theodor-Heuss Schule, Ratingen
8/74-10/75	Zivildienst an der Medizinischen Klinik der Universtät Tübingen

Akademische Ausbildung

8/73-8/74, 10/75-9/81	Studium der Biochemie an der Universität Tübingen
3/80-9/81	Diplomarbeit: "Aktivitäten der Nitratreduktase und der Nitritreduktase von Neurospora crassa unter verschiedenen physiologischen Bedingungen im Hinblick auf eine mögliche Photorezeptoreigenschaft bei Blaulicht-gesteuerten Prozessen", bei Frau Prof. Dr. H. Ninnemann am Institut für chemische Pflanzenphysiologie der Universität Tübingen
10/81-4/82	Forschungsaufenthalt zum Erlernen von Zellkultur-Techniken am Max-Planck Institut für Zellbiologie in Ladenburg
seit 10/81	Doktorarbeit : "Zellbiologische Untersuchungen zur Regeneration isolierter Protoplasten höherer Pflanzen", im Labor von Prof. Dr. F. Hoffmann im Department of Developmental and Cell Biology an der University of California Irvine, unter zusätzlicher Betreuung von Frau Prof. Dr. H. Ninnemann

Akademische Lehrer

E. Bayer, T. Bradley, J. Guglielmi, F. Hoffmann, H. Mauser, D. Mecke, H. Metzner, H. Ninnemann, H. Probst, W. Voelter, U. Weber, G. Weizel, U. Weser